

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory  
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



**Pavel Šenkyřík**

Mechanismy vzniku kryptických přestaveb chromosomů a jejich klinické souvislosti  
Mechanisms of origin of cryptic rearrangements in human chromosomes and its clinical  
associations

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Roman Šolc, Ph.D.

Praha, 2020

**Charles University**  
**Faculty of Science**

## **Poděkování**

Rád bych poděkoval RNDr. Romanu Šolcovi, Ph.D. za cenné rady, věcné připomínky, trpělivost a ochotu při konzultacích a vypracování bakalářské práce.

## **Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 26. 5. 2020

Podpis:

## Abstrakt

Chromosomové přestavby jsou jedním z procesů, které vedou ke vzniku genetických poruch. Mezi mechanismy, které způsobují přestavby, řadíme NAHR, NHEJ, FoSTeS a MMBIR. Zmíněné mechanismy generují přestavby mnoha typů a mají rozdílné nároky na jejich uskutečnění. NAHR je rekombinační mechanismus odpovědný především za rekurentní přestavby, působící zejména v repetitivních sekvencích. NHEJ slouží k opravě dvouřetězcových zlomů a kvůli své chybovosti generuje nerekurentní přestavby. FoSTeS a MMBIR jsou oba replikační mechanismy schopné způsobit jak komplexní přestavby, tak méně rozsáhlé nerekurentní přestavby. Vliv na výše popsané mechanismy má samotná architektura DNA. Struktury ovlivňující průběh nebo efektivitu mechanismů jsou mikrohologie, dvouřetězcové zlomy, tandemové repetice, vlásenky a smyčky schopné zastavit replikaci.

**Klíčová slova:** NAHR, NHEJ, FoSTeS, MMBIR, přestavby chromosomů, dvouřetězcové zlomy, mikrohologie, pozastavení replikace

## Abstract

Chromosomal rearrangements are one of the processes which leads to formation of genetic disorders. Among the mechanisms that cause the rearrangements belong NAHR, NHEJ, FoSTeS and MMBIR. They generate rearrangements of many types and have different requirements for their realization. NAHR is recombination-based mechanism responsible for recurrent rearrangements and operates mainly in repetitive sequences. NHEJ is used for repair of double-strand breaks and generates non-recurrent rearrangements due to its error rate. FoSTeS and MMBIR are replication-based mechanisms able to make both complex rearrangements and less massive non-recurrent rearrangements. Architecture of DNA has influence on all above-mentioned mechanisms. Structures that affect course or effectivity of mechanisms are microhomologies, double-strand breaks, tandem repetitions, hairpins, and loops causing stalling of replication fork.

**Keywords:** NAHR, NHEJ FoSTeS, MMBIR, chromosomal rearrangements, double strand breaks, microhomology, replication stalling

# Obsah

<b>1. Úvod.....</b>	<b>1</b>
<b>2. Mechanismy vzniku přestaveb chromosomů.....</b>	<b>2</b>
2.1 NAHR.....	2
2.1.1 Charakteristika NAHR a podmínky jejího vzniku .....	2
2.1.2 Role v rozdílných buněčných populacích .....	4
2.1.3 Emulace NAHR.....	4
2.1.4 Detekce NAHR .....	4
2.2 NHEJ .....	5
2.2.1 Charakteristika a funkce NHEJ .....	5
2.2.2 Mechanismus NHEJ .....	5
2.2.3 Typy průběhu NHEJ.....	7
2.2.4 Alternativní cesty oprav dvouřetězcových zlomů .....	9
2.2.5 Inhibice NHEJ .....	10
2.3 FoSTeS .....	11
2.3.1 Preferovaná místa vzniku .....	13
2.4 MMBIR .....	13
2.4.1 BIR .....	13
2.4.2 MMBIR .....	14
2.4.3 Regulace BIR a MMBIR.....	16
<b>3. Klinické souvislosti.....</b>	<b>17</b>
3.1 Druhy přestaveb.....	17
3.1.1 Rekurentní přestavby.....	17
3.1.2 Nerekurentní přestavby .....	17
3.1.3 Komplexní přestavby .....	18
3.2 Příklady přestaveb vzniklých pomocí sledovaných mechanismů .....	18
3.2.1 NAHR.....	18

3.2.2	NHEJ .....	19
3.2.3	FoSTeS .....	19
3.2.4	MMBIR .....	20
3.2.5	Parkinsonova nemoc a gen <i>SNCA</i> .....	20
<b>4.</b>	<b>Společná místa vzniku a jejich vliv na mechanismy .....</b>	<b>21</b>
4.1	Mikrohomologie .....	21
4.2	Dvouvláknové zlomy .....	22
4.3	Struktury schopné zastavit replikaci .....	24
<b>5.</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>26</b>
<b>6.</b>	<b>Přehled použité literatury .....</b>	<b>27</b>

## Seznam použitých zkratek

A	adenin	adenine
a-EJ	alternativní spojování konců	alternative end joining
Aj	anglický jazyk	english
<i>Alu</i>	transpozonální sekvence s restrikčním místem pro endonukleázu Alu	transposonal sequence with restriction site for alu endonuclease
AMK	aminokyselina	amino acid
AMP	adenosinmonofosfát	adenosine monophosphate
BIR	zlomem indukovaná oprava	break-induced repair
BLM	helikáza využitá při SSA	bloom syndrome protein
Bp	páry bazí	base pair
BRCA1	tumor supresorový protein podílející se na opravách DNA	breast cancer tumour suppressor 1
BRCT	DNA vazebná doména účastnící se signalizace při odpovědi na poškozenou DNA	DNA binding domain signalling DNA damage
C	cytosin	cytosine
CK 2	kasein kináza 2	casein kinase 2
CNT1A	Charcot-Marie-Toothova choroba typ 1A	Charcot-Marie-Tooth disease type 1A
CRISPR-Cas9	systém využíváný k editaci genomu	clustered regularly interspaced short palindromic repeats-CRISPR associated protein 9
CtIP	endonukleáza spolupracující s MRN komplexem	endonuclease cooperating with MRN complex
CYREN	regulátor buněčného cyklu pro NHEJ	cell cycle regulator of NHEJ
DN 53BP1	dominantně negativní mutant proteinu 1 vázající P53	dominant-negative mutant of P53 binding Protein 1
DN1S	fragment z DN 53BP1	fragment of DN 53BP1
DNA	deoxyribonukleová kyselina	deoxyribonucleic acid
DNA2	nukleáza/helikáza využitá při SSA	nuclease/helicase used in SSA
DNA-PK	DNA-dependentní protein kináza	DNA-dependent protein kinase
DNA-PKcs	DNA-dependentní protein kináza katalytická podjednotka	DNA-dependent protein kinase, catalytic subunit
dsDNA	dvouvláknová DNA	double-stranded DNA
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
Et al.	a kolektiv	and others

Exo1	exonukleáza 1	exonuclease 1
FHA	doména odpovědná za proteinovou interakci závislou na fosfátu	forkhead-associated domain
FoSTeS	pozastavení replikační vidličky a prohození templátů	fork stalling and template switching
G	guanin	guanine
H2AX	X histon z rodiny H2A	H2A histone family member X
HNPP	hereditární neuropatie s tendencí k tlakovým parézám	hereditary neuropathy with pressure palsies
HR	homologní rekombinace	homologous recombination
Kb	kilobáze	kilobase
Ku	proteinový heterodimer vázající se na dvouřetězcové zlomy skládající se z Ku70 a Ku80	protein heterodimer binding to double-strand breaks consist of Ku70 and Ku80
L2 LINE	L2 typ LINE retrotranspozonů	L2 long interspersed nuclear elements, retrotransposons
LCR	vysoce homologní repetitivní segmenty	low copy repeats
<i>LMNB</i>	gen kódující lamin B1 protein	gene encoding lamin B1 protein
MDC1	regulátor buněčného cyklu a protein podílející se na opravě DNA	mediator of DNA damage checkpoint protein 1
<i>MECP2</i>	gen kódující MECP2 protein	region encoding methyl CpG binding protein 2
MEPS	minimální úsek pro efektivní zpracování	minimal efficient processing segment
MMBIR	mikrohomologií zprostředkovaná zlomem indukovaná oprava	microhomology-mediated break-induced repair
MMEJ	mikrohomologií zprostředkované spojování konců	microhomology-mediated end joining
Mre11	protein s exonukleázovou a endonukleázovou anktivitou	protein with 3' to 5' exonuclease and endo nuclease activity
MRN	komplex skládající se z proteinů Mre11, Rad50 a NbS1 hrající roli při opravě dvouřetězcových zlomů	complex consists of Mre11, Rad50 and NbS1 participating in double-strand breaks repair
MSH2	protein hrající roli při opravě DNA, homolog mutS 2	mutS homolog 2
MSH3	protein hrající roli při opravě DNA, homolog mutS 3	mutS homolog 3

NAHR	nealelická homologní rekombinace	non-allelic homologous recombination
Nbs1	nibrin, protein rekrutující další proteiny k opravě zlomů	nibrin, protein recruiting another proteins for DNA break repair
<i>NF1</i>	gen kódující nurofibromin	gene encoding neurofibromin
NHEJ	nehomologní spojování konců	non-homologous end joining
PAXX	paralog CRXX4 a XLF	paralog of XRCC4 and XLF
PLP1	proteolipid protein 1, jeho mutace způsobuje PMD	proteolipid protein 1
PMD	Pelizaeusova-Merzbacherova choroba	Pelizaeus-Merzbacher disease
PNK	polynukleotidkináza	polynucleotide kinase
Rad50	protein vážící DNA konce	DNA ends binding protein
Rad51	rekombináza Rad51, slouží k opravě dvouřetězcových zlomů	Rad51 recombinase
Rad52	rekombináza Rad52, slouží k opravě dvouřetězcových zlomů	Rad52 recombinase
RecA	protein bakteriální rekombinace	protein of bacterial recombination
RPA	protein vážící jednovláknovou DNA	replication protein A
SCID	těžká kombinovaná imunodeficiencie	severe combine immunodeficiency
SCORE	jednoduše naváděné CRISPR/Cas cílené na repetitivní oblasti	single-guide-CRISPR/Cas-targeting-of-repetitive-elements
<i>SNCA</i>	gen kódující alfa synokluein	gene encoding alpha synocluein
SRO	nejmenší oblast překryvu	smallest regions of overlap
SSA	mechanismus opravy dvouřetězcového zlomu bez závislosti na Ku	single strand annealing
ssDNA	jednovláknová DNA	single-stranded DNA
T	thymín	thymine
TDP1	tyrosyl DNA fosfodiesteráza 1	tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1
TDT	terminální deoxynukleotidyltransferáza	terminal deoxynucleotidyl transferase
V(D)J	druh rekombinace probíhající u lymfocytů	recombination in lymphocytes between variable, joining and diversity gene segments
XLF	faktor podobný XRCC4	XRCC4 like factor
XPF-ERCC1	proteinový komplex účastní se opravy DNA a rekombinace	DNA repair endonuclease XPF-DNA excision repair protein ERCC-1
XRCC4	protein umožňující interakce DNA ligázy IV během NHEJ	X-ray repair cross-complementing protein 4



# 1. Úvod

Genomové přestavby jsou jedním z procesů, které mohou alterovat genetickou informaci v širším kontextu, než je pouhá záměna nukleotidů a tím vést ke vzniku genetických onemocnění. Tyto přestavby jsou často generovány mechanismy závislými na specifické architektuře genomu, která přispívá k jejich uskutečnění. K přestavbám běžně dochází v okolí dvouřetězcových zlomů, tandemových repetitív či struktur schopných zastavit replikaci (Gu et al. 2008).

V této práci bych se chtěl zaměřit na mechanismy vzniku kryptických přestaveb chromosomů a nalezení souvislostí mezi jednotlivými mechanismy. Mezi sledované mechanismy budou patřit NAHR (non-allelic homologous recombination), NHEJ (non-homologous end joining), FoSTeS (fork stalling and template switching) a MMBIR (microhomology-mediated break-induced repair). Jedná se buď o reparační mechanismy, které ale generují nějaké změny oproti původní genetické informaci, nebo o mechanismy, které mají spontánnější charakter a jsou vyvolány genovou architekturou. Jmenované mechanismy jsou schopny vytvořit delece, duplikace, inverze, inserce a translokace (Lupski 1998). Replikační mechanismy FoSTeS a MMBIR jsou schopny vytvořit komplexní přestavby ovlivňující rozsáhlejší oblasti a kombinující více druhů mutací (Zhang et al. 2009).

Tato práce si klade za cíl shrnout základní informace o mechanismech vyvolávajících genomové přestavby. Charakterizovat typická místa, která přispívají k uskutečnění přestaveb pomocí jednotlivých mechanismů. Dále porovnat nároky mechanismů na strukturu DNA a nalézt spojitosti mezi mechanismy přestaveb chromosomů.

## **2. Mechanismy vzniku přestaveb chromosomů**

### **2.1 NAHR**

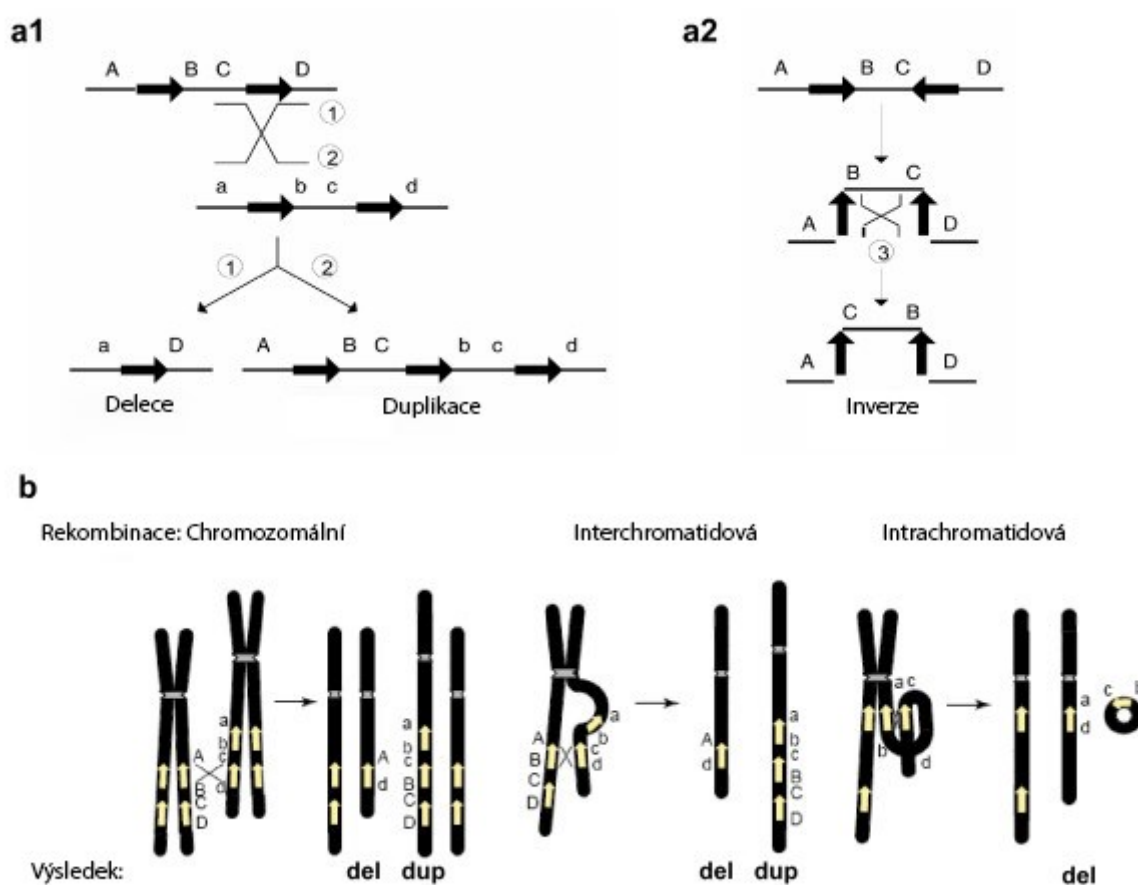
#### **2.1.1 Charakteristika NAHR a podmínky jejího vzniku**

NAHR je zkratka z anglického jazyka pro nealelickou homologní rekombinaci (non-allelic homologous recombination). Od klasické homologní rekombinace se liší tím, že probíhá mezi dvěma sekvencemi, které jsou si podobné, ale nejedná se o alely téhož genu (Lupski 2004). Významnou roli při uskutečnění nealelické homologní rekombinace hraje několik faktorů, jejichž charakter je jak sekvenčně specifický, tak i strukturní.

##### **2.1.1.1 LCR oblasti**

Tato podobnost spočívá ve vysoké sekvenční identitě pohybující se v rozmezí od 95 % do 97 % a nalezneme ji především v LCR (low-copy repeats), což jsou oblasti o délce od 10 kb až po délku 400 kb, jež mohou obsahovat geny, pseudogeny, části genů, endogenní retrovirové sekvence či jiné paralogní části. V těchto oblastech se mohou nalézat série genů, v tom případě se jedná o opakující se genové klastry. Domníváme se, že LCR oblasti nejspíše vznikly duplikací genových segmentů v paralogních regionech (Stankiewicz a Lupski 2002). LCR mohou díky své vysoké sekvenční podobnosti být využity během meiózy i mitózy jako substrát pro homologní rekombinaci. Vzájemná orientace dvou LCR má vliv na výslednou přestavbu genomu, jak je možno vidět v obrázku 1. Pokud se dvě LCR nachází na stejném chromosomu ve stejné orientaci, pomocí homologní rekombinace vznikne duplikace a delece. Jestliže jsou LCR ve vzájemně opačné orientaci, dojde k inverzi segmentu ohraničeného těmito dvěma LCR. Pokud dojde k rekombinaci mezi LCR na jiných chromosomech, výsledkem bude translokace (Lupski 1998). Například u onemocnění Charcot-Marie-Tooth typu 1A (zkráceně CNT1A) a u hereditární neuropatie s tendencí k tlakovým parézám (zkráceně HNPP) se v LCR nachází rekombinační hot spot o délce 1,7 kb a v 98 % případů zde dochází k rekombinaci. Z toho vyplývá, že k rekombinaci nedochází v libovolném úseku délky repetice, ale častěji v tomto jednom místě, přestože tyto úseky nevykazují výrazně vyšší sekvenční homologii než zbytek oblasti. Musí zde tedy být jiný signál, který vede k preferenci rekombinace v tomto místě (Reiter et al. 1996). Tímto signálem by mohly být dvouřetězcové zlomy, protože se poblíž hot spotů NAHR nachází struktury DNA, které mohou vést k jejich vzniku. Skutky schopné vytvářet zlomy jsou transpozony, minisatelity, palindromy a DNA v jiné než v B konformaci (Wells 2007). Příkladem může být Mariner-like transpozon, který

se vyskytuje v blízkosti hot spotu již zmíněných CMT1A a HNPP (Reiter et al. 1996). U přibližně 50 chorob, které vznikají přestavbou v genomu, byla prokázána souvislost s DNA jiné než B konformace (Wells 2007). Pokud se tato DNA nachází ve specifickém lokusu poblíž repetitivních sekvencí, může indukovat vznik genomové přestavby. Tyto odlišné konformace jsou často vynuceny typickým pořadím nukleotidů či opakováním rozličných motivů (Wells 2007). Studie Lindsay ukázala také další zajímavou věc, že hot spoty pro NAHR v LCR oblastech jsou lokalizovány v těsné blízkosti hot spotů pro klasickou alelickou homologní rekombinaci (Lindsay et al. 2006).



**Obrázek 1:** Přehled možných rekombinací vznikajících pomocí NAHR. Tlusté černé šipky v obrázcích **a** znázorňují orientaci LCR. Písmena značí alely genů. V případě **1** dojde k delecí, v případě **2** vznikne duplikace a v případě **3** inverze. V obrázku **b** znázorňují žluté šipky orientaci LCR na chromosomech. Zleva doprava můžeme vidět translokaci mezi chromosomy, chromatidami, a nakonec vznik delecce po intrachromatidové rekombinaci. Upraveno podle (Gu et al. 2008).

### 2.1.1.2 Minimální úsek pro efektivní zpracování

Aby mohla rekombinace úspěšně proběhnout, musí se v LCR nacházet minimální úseky pro efektivní zpracování. (Minimal Efficient Processing Segment zkráceně MEPS). Jsou části

LCR oblastí, které mají vliv na efektivitu nealelické homologní rekombinace. Tyto úseky mají mezi sebou extrémně vysokou sekvenční podobnost. Skupina Waldman ve své studii ukázala, že stačí pouze dvounukleotidová záměna v těchto segmentech, díky ní došlo ke zkrácení nejdelší nepřerušené homologie mezi dvěma LCR z 232 na 134 párů bazí. Toto zkrácení mělo za výsledek až dvacetinásobný pokles intrachromosomální rekombinace (Waldman a Liskay 1988).

### **2.1.2 Role v rozdílných buněčných populacích**

Vzhledem k absenci sesterských chromatid a homologních chromosomů v určitých stádiích pohlavních buněk, nezbyvá moc jiných možností než nealelických oprav. NAHR často reflektuje chyby, které se objevily během meiózy, nebo opravy dvouřetězcového zlomu (Roychowdhury a Abyzov 2019). Tyto nealelické opravy vedou k přestavbám, které mohou způsobit vznik genomových onemocnění (Turner et al. 2008). Tato onemocnění mohou být dvojího typu, buď dědičné, pokud k přestavbě došlo právě v linii pohlavních buněk nebo sporadické, pokud se přestavba vyskytla *de novo* (Lupski 2007).

S NAHR se můžeme setkat i během mitózy u populace somatických buněk. Výsledkem je vytvoření mosaikové populace tělních buněk, které nesou vzniklou přestavbu. Většina tělních přestaveb vzniká pomocí NAHR. Je velmi pravděpodobné, že mnoho druhů rakovin má původ právě v těchto přestavbách (Darai-Ramqvist et al. 2008).

Je zde i možnost, že stejné páry LCR oblastí budou zprostředkovávat jak rekombinaci mitotickou, tak meiotickou. Například u LCR REPA a REPB na 17p11.2 jsou důležitým mediátorem somatické rekombinace při lidské neoplasii (Barbouti et al. 2004) a také se často podílí na meiotické rekombinaci způsobující velikou variabilitu v rozdílných populacích (Carvalho a Lupski 2008).

### **2.1.3 Emulace NAHR**

Skupině Tai et al. se podařilo pomocí jejich systému SCORE (Single-guide-CRISPR/Cas-targeting-Of-Repetitive-Elements) emulovat průběh NAHR a vytvořit tak uměle vzniklou genetickou přestavbu mimikující přestavby vznikající pomocí NAHR. Tím otevřeli dveře možnostem snadné simulace těchto přestaveb (Tai et al. 2016).

### **2.1.4 Detekce NAHR**

Detekce míst, kde proběhlo NAHR je složité z mnoha důvodů. Místa NAHR se vždy nachází v oblastech repetice, kterých najdeme v lidském genomu miliony (Bailey 2001). Také místo po

přestavbě vypadá skoro stejně vzhledem k vysoké míře homologie okolí místa zlomu s templátem. Za zmínku tedy stojí úspěch výzkumné skupiny Parks et al., která dokázala sestrojit pravděpodobnostní model výskytu NAHR. K sestrojení modelu jim pomohla skutečnost, že každý pár repetice se od sebe drobně liší a tyto odlišnosti využili k charakterizaci repetice. LCR které obsahovalo zlom, je ve skutečnosti hybridním LCR, které vzniklo pomocí NAHR a bylo vytvořeno z LCR, které ohraničovaly místo zlomu. Model byl sestrojen pouze, aby dokázal hledat místa vzniku NAHR v oblastech, kde se jeho výskyt předpokládá (Parks et al. 2015).

## **2.2 NHEJ**

### **2.2.1 Charakteristika a funkce NHEJ**

Za zkratkou NHEJ se skrývá v překladu nehomologní spojování konců (non-homologous end joining) (Chang et al. 2017). Tento mechanismus je primárně využíván k opravě dvouřetězcových zlomů DNA, které mohly vzniknout například ionizačním zářením, působením kyslíkových radikálů, chybou replikačního systému nebo při štěpení nukleázami. Jak fyziologicky vznikající zlomy, tak zlomy způsobené nechtěně vyžadují úpravu konců nukleázami a následnou opravu DNA polymerázami (Meek et al. 2008).

### **2.2.2 Mechanismus NHEJ**

Při NHEJ je dvouřetězcový zlom nejprve rozpoznán pomocí heterodimeru Ku, tvořeného dvěma proteiny Ku70 a Ku80, který nasedá na DNA a následně rekrutuje další proteiny potřebné pro NHEJ. Katalytická podjednotka DNA dependentní protein kinázy má vysokou afinitu pro konce DNA s navázaným Ku a navázáním na DNA s Ku vytvoří komplex DNA-PKcs (Meek et al. 2008). Většina dvouřetězcových zlomů má nekompatibilní konce, které brání přímé ligaci. Pomocí nukleázové aktivity ale můžeme konce upravit tak, abychom docílili kompatibility obou konců. Při NHEJ je této kompatibility dosaženo pomocí degradace 3' či 5' přesahu endonukleázami nebo exonukleázami a vytvořením krátkého úseku mikrohologie, což je úsek o délce 4 a méně nukleotidů, mezi oběma vlákny. Tím se liší od homologiemi řízených opravných mechanismů, které vyžadují homologii o délce alespoň 20 nukleotidů. Při NHEJ je využívána endonukleáza Artemis, která je rekrutována v komplexu s DNA-PK. Komplex DNA-PKcs podstoupí autofosforylaci a aktivuje Artemis (Goodarzi et al. 2006). Takto aktivovaná Artemis dokáže stříhat mnoho DNA na rozhraní jednovláknové a dvouvláknové DNA (Chang et al. 2015). Artemis má vlastní 5' exonukleázovou aktivitu na jednovláknové DNA i bez navázání komplexu DNA-PKcs (Li et al. 2014). S navázaným

komplexe DNA-PKcs na dvouvlákně DNA má Artemis endonukleázovou aktivitu na 5' i 3' přesahu ve zlomu. Tato aktivita se využívá i při V(D)J rekombinaci. Porucha této aktivity vede ke SCID imundeficienci (Moshous et al. 2001).

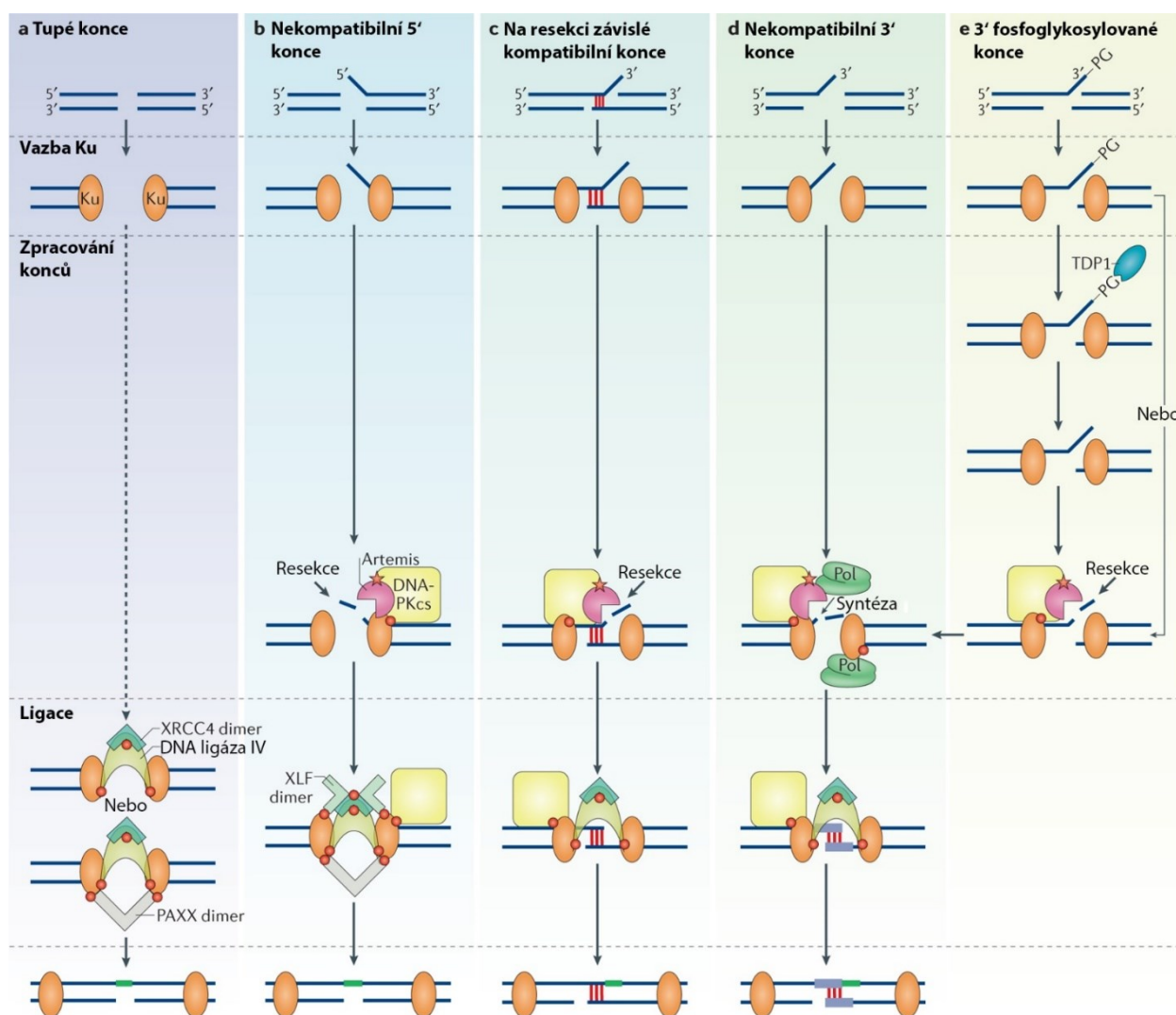
NHEJ se u člověka mohou účastnit dvě polymerázy z rodiny Pol X polymeráz. Jedná se o polymerázu  $\mu$  a polymerázu  $\lambda$ . Obě umí inkorporovat deoxyribonukleotidy i ribonukleotidy (Bebenek et al. 2014; Moon et al. 2014). Díky tomu může dojít k zařazení ribonukleotidů do DNA, ty jsou ale následně odstraněny pomocí excizních oprav (Nick McElhinny a Ramsden 2003). Tyto polymerázy interagují s proteinem Ku svými N-terminálními BRCT doménami. Ty jsou odpovědné za interakci s dalšími proteiny nebo s DNA. Odstranění BRCT domény u  $\mu$  polymerázy nemá vliv na polymerázovou aktivitu, ale na sílu navázání polymerázy na DNA, protože se polymeráza  $\mu$  váže silněji na komplex KU DNA než na samotnou DNA (Ma et al. 2004). Další polymerázou z této rodiny je polymeráza  $\beta$  TDT, které chybí BRCT doména, a proto se neúčastní interakcí s KU komplexem. Polymerázy z ostatních rodin se NHEJ mohou zúčastnit, pokud budou mít k dispozici nějaký templát, což výše zmíněné polymerázy z rodiny pol X nepotřebují.

Nejběžnějšími centrálními prvky NHEJ u eukaryot jsou DNA ligáza IV a protein XRCC4 (Lieber 2010). XRCC4 stimuluje enzymovou aktivitu DNA ligázy IV (Grawunder et al. 1997). Dalším hráčem při ligaci je XLF, což je protein s trochu podobnou sekvencí AMK a strukturou jako XRCC4. Společně s XRCC4 vytvoří komplex, který omotá dvouvlákno DNA. Proteiny XRCC4 a XLF spolu interagují pomocí svých N konců (Brouwer et al. 2016). Komplex XRCC4-XLF pravděpodobně stabilizuje pozice konců DNA před kovalentní ligací. Za zmínku také stojí protein PAXX, jenž je paralogem XRCC4 a XLF a plní nejspíše obdobnou funkci (Ochi et al. 2015).

Pokud je potřeba nějakým způsobem upravit DNA před proběhnutím NHEJ, jsou zapojeny i další proteiny. Příkladem může být polynukleotidkináza (PNK), která se účastní NHEJ pokud na 5' konci chybí fosfát nebo může sloužit i k odstranění 3' fosfátu, který může vzniknout na DNA při oxidativním poškození (Bernstein et al. 2005). Druhým proteinem, který se vyskytuje v NHEJ situačně je aprataxin. Aprataxin slouží k odstranění AMP skupiny z 5' konce DNA ve zlomu. Tato aktivita je potřeba v případě, že ligáza IV nedokončí správně ligaci a vznikne zde meziprodukt, ve kterém je navázáno AMP na 5' konci (Ahel et al. 2006). Jak aprataxin tak PNK se váží na XRCC4 pomocí své FHA domény, jež se nachází blízko jejich N-koncům, poté co XRCC4 bylo fosforylováno CK2 kinázou (Koch et al. 2004).

### 2.2.3 Typy průběhu NHEJ

Některé zlomy mohou být opraveny jen pomocí komplexu ligázy, jiné vyžadují účast polymeráz nebo nukleáz. Takto můžeme NHEJ rozdělit na několik různých druhů, podle spojovaných konců (Chang et al. 2017). Schéma procesů oprav je možno nalézt v obrázku 2.



**Obrázek 2:** Opravy rozličných dvouvláknových zlomů pomocí NHEJ. Modré čáry znázorňují řetězce DNA. Červená kolečka znázorňují známé protein-proteinové interakce, červená hvězdička znázorňuje interakci Artemis s DNA-PKcs. Zeleným obdélníčkem je označeno místo ligace na vrchním vlákně DNA, nevyhnutelně dojde i k ligaci na spodním vlákně. **a** Oprava tupých konců nepotřebuje úpravu konců a může být provedena paralogy XRCC4 nebo PAXX. **b** Při opravě 5' nekompatibilního konce dojde nejdříve k resekci 5' konce pomocí komplexu Artemis-DNA-PKcs a následné ligaci tupého konce pomocí XLF a PAXX. **c** Oprava kompatibilních konců s krátkým úsekem homologie (4bp) a krátkým přesahem vyžaduje resekci přesahu pomocí Artemis-DNA-PKcs a poté je možná ligace. **d** Nekompatibilní 3' konce vyžadují k opravě uštíhnutí přesahu pomocí Artemis-DNA-PKcs a následnou syntézu krátkého párujícího úseku pomocí polymerázy Pol. **e** 3' fosfoglykosylované konce jsou upraveny pomocí tyrosyl DNA fosfodiesterázy (TDP1). Případně Artemis-DNA-PKcs překoná fosfoglykosylaci a možná i další modifikace a následně endonukleolyticky uštíhne konce s modifikacemi. Upraveno podle (Chang et al. 2017)

### **2.2.3.1 Ligace tupých konců**

Ligace tupých konců pomocí NHEJ postrádá mikrohomologie a k úspěšnému spojení konců vyžaduje protein KU. Na druhou stranu spojování konců s mikrohomologiemi KU nevyžadují (Gu et al. 2007). Hlavní silou NHEJ při spojování tupých konců je komplex KU-XRCC4-Ligáza IV. Tento komplex je zformován následujícím způsobem. Nejprve se váže KU na DNA konce a následně rekrutuje komplex XRCC4-ligáza IV (Mimori a Hardin 1986). Ligáza IV váže KU pomocí dvou BRCT domén a XRCC4 se váže do oblasti mezi tyto dvě domény (Costantini et al. 2007). Výsledkem je ligace tupých konců bez úprav, protože přidání Artemis, polymerázy  $\mu$  nebo DNA-PKcs dále nestimulovalo ligaci. Díky tomu se došlo k úsudku, že je přímá ligace preferována před úpravou tupých konců (Chang et al. 2017).

### **2.2.3.2 Ligace nekompatibilního 5' konce**

Nyní mějme na mysli dvouvláknový DNA zlom, který má na jednom konci 5' přesah a druhý opačný konec je tupý. Do tohoto procesu se již zapojí výše zmíněné proteiny, a to Artemis a DNA-PKcs. DNA-PKcs se váže na protein KU a aktivuje endonukleázovou aktivitu Artemis na DNA koncích svojí autofosforylací (Goodarzi et al. 2006). Tato autofosforylace zapříčiní disociaci C-koncové inhibiční oblasti od N-koncové katalytické domény. Takto aktivní Artemis je schopen odstranit 5' přesahující konec a upravit tak zlom, aby mohl být ligován pomocí komplexu XRCC4-ligáza IV. Na 5' přesahujícím konci je Artemis schopen štěpit DNA přímo na rozhraní ssDNA-dsDNA (Chang et al. 2017).

### **2.2.3.3 Ligace nekompatibilního 3' konce**

Nyní se podíváme na opačnou situaci s 3' přesahujícím koncem, který figuruje ve dvouvláknovém zlomu. Přesahující 3' konec je odbourán stejnou mašinerií, tedy komplexem Artemis-DNA-PKcs, jako přesahující 5' s tím rozdílem, že protein Artemis neodbourá celý 3' přesah, ale nechává čtyřnukleotidový přesah na 3' konci (Blommers et al. 1989). Vytvoření tohoto přesahu je možno vysvětlit tak, že komplex Artemis-DNA-PKcs tento přesah okupuje při úpravě konce (Chang et al. 2015). Následně se do procesu zapojí polymerázy. Polymeráza  $\mu$  a  $\lambda$  mají BRCT doménu, pomocí níž jsou se schopny navázat na KU-DNA komplex (Ma et al. 2004). Polymerázová aktivita polymerázy  $\mu$  je na templátu nezávislá, kdežto u polymerázy  $\lambda$  je na templátu závislá (Nick McElhinny et al. 2005). Liší se v Loop 1 a tato oblast je strukturně flexibilní a umožňuje vytvářet vodíkové vazby s templátem a polymeráza  $\mu$  může přidávat nukleotidy bez templátu (Moon et al. 2007). V reakcích, kde figuruje jen KU-XRCC4-DNA ligáza IV komplex, velmi pomáhá s ligací 3' nekompatibilního konce. Na těchto přesazích může polymeráza  $\mu$  přidat několik nukleotidů a



vytvořit tak oblast mikrohologie pro následné párování bazí a ligaci (Gu et al. 2007). Zde potřebnost polymerázy  $\mu$  nekončí, dále je třeba pro připojení dvou substrátů DNA s krátkým 3' přesahem o délce od 1 do 2 nukleotidů (Pryor et al. 2015). V neposlední řadě se podílí na vytvoření terminálních mikrohologií při spojování dvou konců s 3' přesahy po úpravě konců komplexem Artemis-DNA-PKcs (Chang et al. 2016).

#### **2.2.3.4 Ligace fosfoglykosylovaného 3' konce**

Pokud nastane situace, že ionizované záření vytvoří zlom s 3' fosfoglykosylovaným koncem, tak takovýto konec nemůže být ligován běžným způsobem, ale potřebuje být nejprve upraven, tak aby na 3' konci byla hydroxylová skupina a na 5' konci fosfátová skupina. Tuto modifikaci na 3' konci může odstranit TDP1. TDP1 mutantní buňky jsou ale jenom minimálně radiosenzitivní a na druhou stranu buňky s mutantním Artemis jsou radiosenzitivní, lze tedy předpokládat, že se Artemis podílí na odstranění poškozeného vlákna. A bylo již potvrzeno, že Artemis se v komplexu s DNA-PKcs umí tyto konce odbourat (Povirk et al. 2007). Po úpravě konců je postup stejný, jako v případě 3' přesahu.

#### **2.2.3.5 Ligace dvou kompatibilních konců**

Pokud budeme mít přesah na obou koncích s krátkou mikrohologií o délce 4 párů bazí, komplex Artemis-DNA-PKcs odštíhne přesah za mikrohologií a je schopen tento zlom rovnou zaligovat (Chang et al. 2017).

### **2.2.4 Alternativní cesty oprav dvouřetězcových zlomů**

#### **2.2.4.1 MMEJ**

Další cestou pro opravu zlomů je Microhomology-mediated end joining se zkratkou MMEJ. V češtině lze nazvat jako mikrohologií řízené spojování konců. Jedná se o cestu, která využívá rekombinaci mezi mikrohologiemi k opravě dvouřetězcových zlomů. MMEJ bylo objeveno u kvasinek, ale již byla nalezena většina orthologních proteinů u savců (Mitch McVey a Sang Eun Lee 2008). Prvním krokem pro uskutečnění opravy pomocí MMEJ je úprava 5' konce DNA pomocí Mre11-Rad50-Nbs1 (MRN) komplexu v asociaci s retinoblastom vážícím proteinem 8 (CtIP), abychom získali 3' jednovláknový přesah (Williams et al. 2010). Tímto způsobem se upraví oba konce dvouvláknového zlomu a takto odhalené 3' přesahy se mohou pomocí mikrohologie spárovat. Vznikne tak spojený komplex, který má ještě mezery, jež je nutno zacelit. Nekomplementární 3' přesahy jsou následně odštíhnuty komplexem excizních oprav a mezery jsou vyplněny pomocí polymerázy  $\lambda$  (Ahmad et al. 2008; Crespan et al. 2012), DNA ligáza I a ligáza IIIa jsou

následně zodpovědné za ligaci nových úseků k původnímu vlákně (Della-Maria et al. 2011). MMEJ vyústí sice k opravě cíleného zlomu, ale během procesu dochází k deletování úseku, který ohraničoval původní zlom, jedná se tedy o mechanismus, který je schopen zanášet chyby do genomu při jeho opravách.

#### **2.2.4.2 Single strand annealing (SSA)**

Tento mechanismus má také za úkol zacelit dvouřetězcový zlom a je toho schopen stejně jako MMEJ bez závislosti na Ku. K tomu, aby byla k opravě využita tato cesta, je nutno, aby pomocí MRN komplexu a CtIP došlo k resekci, která vygeneruje 15–100 nukleotidový 3' přesah. Tento ssDNA přesah je nadále protahován pomocí enzymů (Symington 2016). Jsou celkem 3 enzymy, které mohou takto působit při SSA. Jedná se o nukleázy EXO1 a DNA2 a helikázu BLM (Zhu et al. 2008). Tento dlouhý 3' přesah nezůstává odhalen a je navázán na několik kopií proteinu RPA. RPA takto vytvoří z jednovláknové DNA vlákno, které je stabilní a neformuje další sekundární struktury. Během homologní rekombinace nahradí Rad51 RPA, aby mohl najít homologii a zahájit invazi ssDNA (Sung et al. 2003, s. 51). SSA je ale na Rad51 nezávislá dráha, která spoléhá na dostatečnou homologii mezi 3' ssDNA přesahem a homologní oblastí. To vede k velké promiskuitě a dělá z SSA nekonzervativní mechanismus, který tíhne ke generování translokací a delecí. Annealing ssDNA je zprostředkován proteinem Rad52. Před následnou ligací musí být nehomologní DNA na 3' konci odstraněna. Toto odstranění má na starost komplex XPF-ERCC1 a opravný komplex MSH2-MSH3 (Pâques a Haber 1997; Bhargava et al. 2016).

#### **2.2.5 Inhibice NHEJ**

Vzhledem k náchylnosti NHEJ k vytváření chyb během opravy dvouřetězcových zlomů je důležité, aby buňky, pokud je to možné, k opravě zlomu použily homologní rekombinaci. Během fáze G1 buněčného cyklu je homologní rekombinace inhibována a NHEJ je dominantním mechanismem. Ve fázích S a G2 jsou oba mechanismy aktivní a mohou spolu soupeřit (Panier a Boulton 2014). Zatím ale nebylo jasné, proč během S a G2 NHEJ s mnohem hojnější enzymovou mašinérií nedominuje. Podobně jako je tomu i u fúze nechráněných telomer, která probíhá specificky ve fázi G1 pomocí NHEJ (Konishi a de Lange 2008). Odpověď můžeme nalézt v proteinu CYREN. CYREN je regulátor buněčného cyklu pro NHEJ. Pokud došlo ke knock-outu genu tohoto proteinu v buňkách, došlo ke zvýšení počtu oprav pomocí NHEJ a k redukci homologní rekombinace ve fázích S a G2. Také se ukázalo, že nedostatek proteinu CYREN nemá vliv na opravu zlomů s tupými konci. Nicméně u zlomů s přesahy byla při vyřazení CYREN sledována až 40% redukce homologní

rekombinace. CYREN nejspíše ovlivňuje vazbu Ku na zlomy s přesahem, zabraňuje tak NHEJ a vytváří prostředí vhodnější pro homologní rekombinaci (Arnoult et al. 2017).

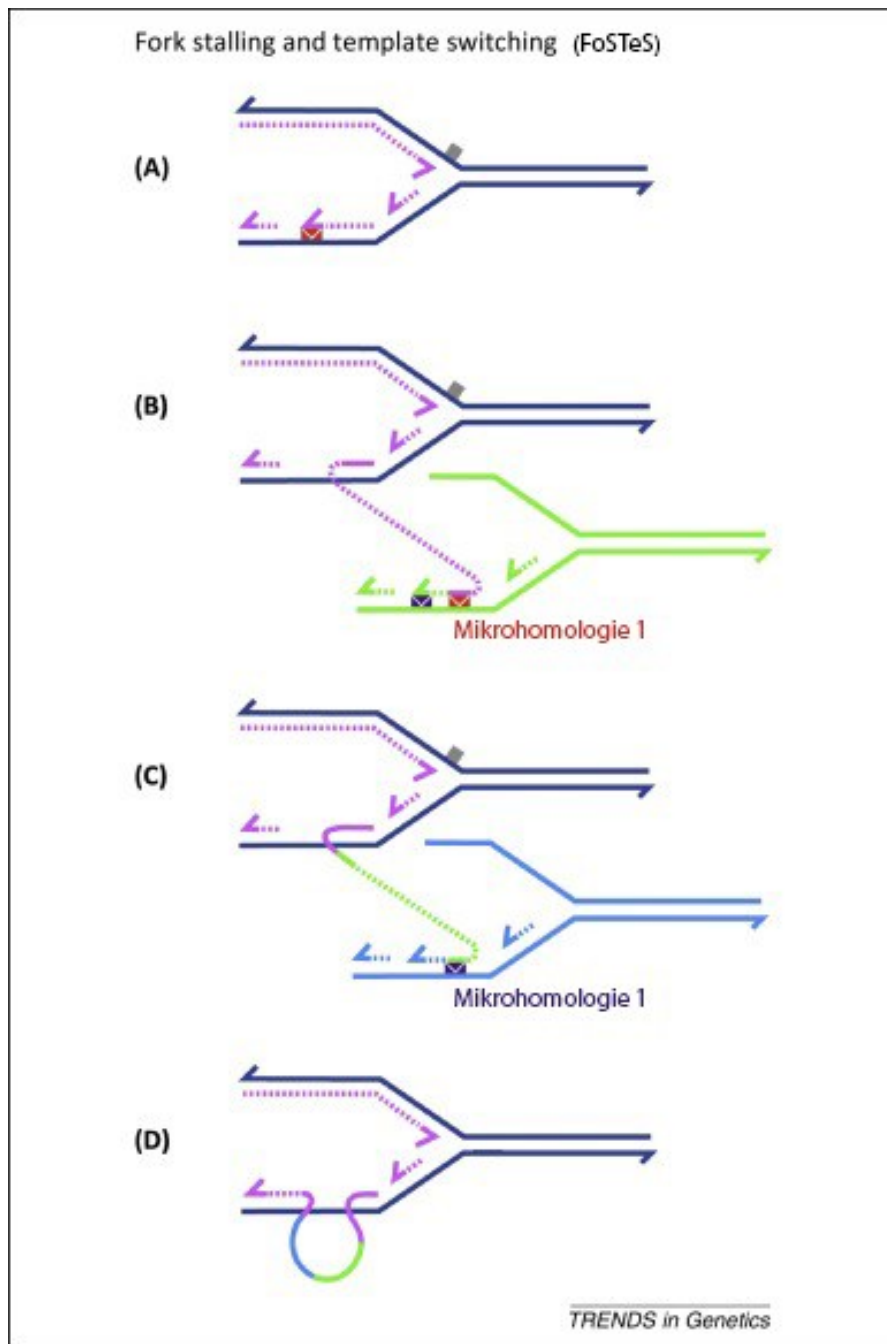
#### **2.2.5.1 Inhibice NHEJ v genovém inženýrství**

Při editaci genomu pomocí CRISPR-Cas9 je potřeba, aby zlomy vzniklé pomocí této metody byly opravovány homologní rekombinací, a ne pomocí NHEJ. Snahou o zlepšení byla celková inhibice NHEJ, ale ta má nežádoucí vedlejší účinky vedoucí k selhání kostní dřeni, stárnutí kmenových buněk a zvýšení pravděpodobnosti rakoviny (Zhang et al. 2015; Qing et al. 2014; Zhang et al. 2011). Cílem výzkumu skupiny Jayavaradhan et al. (2019) bylo přijít na mechanismus, který na konkrétních místech, kde probíhá editace pomocí CRISPR-Cas9 zabránil NHEJ, ale neovlivnil NHEJ globálně. Skupina vytvořila fúzovaný protein skládající se z Cas9, spojeného s fragmentem nazvaným DN1S. DN1S je fragment z DN 53BP1, který je schopný se rekrutovat na místo dvouvláknového zlomu a zároveň postrádá domény, které interagují s efektory NHEJ. Tím se jim podařilo zablokovat NHEJ na zlomech vyvolaných pomocí CRISPR-Cas9 a v některých případech zvýšit pravděpodobnost opravy pomocí homologní rekombinace.

### **2.3 FoSTeS**

Je další z mechanismů, pomocí něž může docházet k přestavbám DNA. Tento mechanismus je zodpovědný, za komplexnější genomové přestavby, které by nemohly vzniknout pomocí NHEJ či NAHR, protože kromě duplikací, či delecí fragmentů DNA se některé z těchto fragmentů nalézaly v opačné orientaci nebo byly translokovány do jiné oblasti (Lee et al. 2007). Tento model byl inspirován podle objevů v *E. coli* (Slack et al. 2006). Fork Stalling and Template Switching, jak zní původní název modelu v Aj, probíhá následujícím způsobem. Během replikace se replikační vidlička zastaví na jedné pozici a opožděné vlákno se vyprostí z původního templátu a na základě mikrohomologie na 3' konci se začlení do jiné replikační vidličky v blízkosti. V této nové vidličce pokračuje znova replikace DNA (Lee et al. 2007). Protože se v nové replikační vidličce původní vlákno chová jako primer a způsobuje svoji vlastní extenzi, způsobuje místo zlomů spíše spoje, které následně vedou k transpozici genových segmentů na jiné místo. Bližší popis nalezneme v obrázku 3. Pokud dojde k invazi downstream replikační vidličky, výsledkem bude delece, kdežto invaze upstream replikační vidličky povede k duplikaci. Na výslednou orientaci fragmentu má také vliv, jestli bylo invadováno vedoucí nebo opoždující se vlákno a směr postupující replikační vidličky. Nově vzniklý fragment může tedy být invertovaný oproti původní orientaci nebo si ji může zachovat. Tato procedura uvolnění, napadení a syntézy se může opakovat několikrát za sebou.

Tato skutečnost reflektuje malou procesivitu zúčastněné polymerázy a také to, že tímto procesem mohou vznikat komplexní přestavby (Gu et al. 2008).



**Obrázek 3:** Schéma průběhu FoSTeS. **A** Dojde k pozastavení replikace při kontaktu replikační vidličky s lézí na DNA (vyznačeno šedě). **B** Opožďující vlákno se uvolní z replikační vidličky a nasedne na mikrohomologii (označena červeně) v blízké aktivní replikační vidličce a zahájí se syntéza DNA. **C** Dojde znova k vyvléknutí opoždujícího vlákna a invazi jiné aktivní replikační vidličky. Nyní se páruje podle fialové mikrohomologie a dojde obnově syntézy DNA. **D** Případně se opoždující vlákno vrátí do původní replikační vidličky a replikace pokračuje až do konce chromosomu. Upraveno podle (Ottaviani et al. 2014)

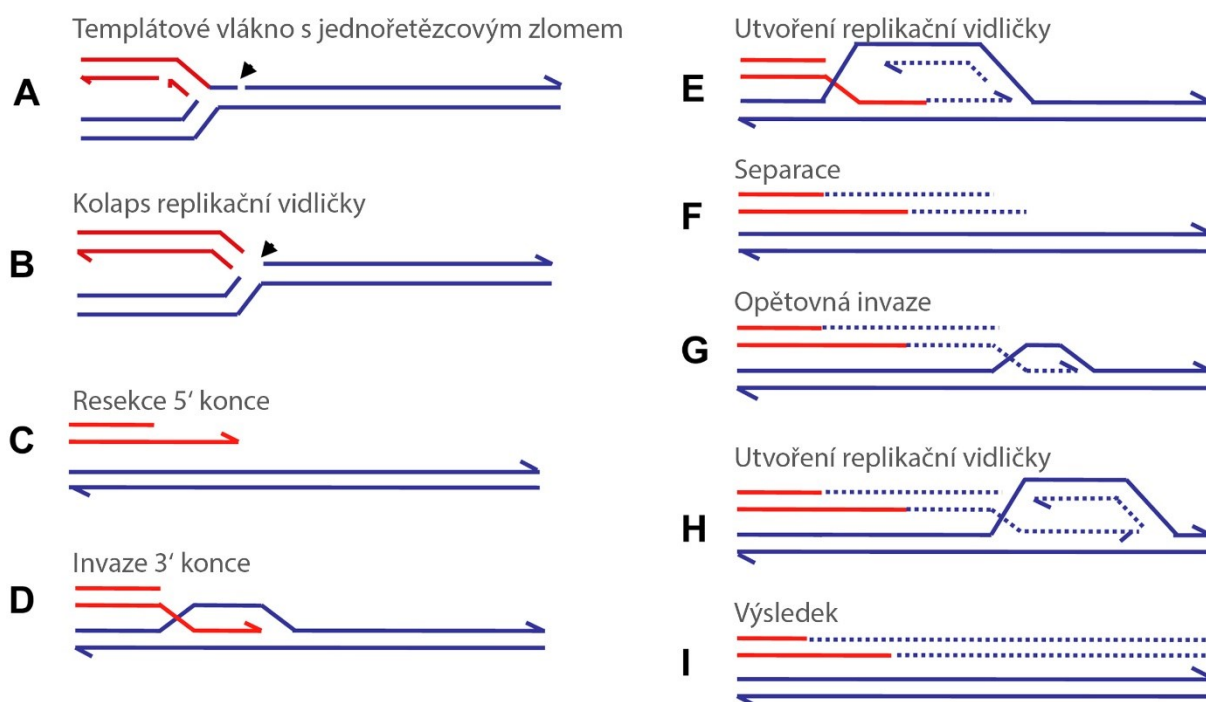
### 2.3.1 Preferovaná místa vzniku

Proces jako FoSTeS by neměl probíhat bez příčiny a má jistě nějaké podmínky či preference k jeho uskutečnění. Jedním z takových míst jsou LCR. Ačkoli přímo nezprostředkovávají FoSTeS pravděpodobně se podílejí na fyzickém přiblížení replikačních vidliček k sobě a tím napomáhají k výměně templátu (Gu et al. 2008). Další prvky lokální genomové struktury jako GC bohaté sekvence a *Alu* repetice byly nalezeny poblíž regionu *MECP2*, kde k FoSTeS často dochází (Bauters et al. 2008). Tyto struktury svojí povahou mohou vést k pozastavení replikace. Lidské *Alu* repetice obsahují vidličku pozastavující homonukleotid (A/T) o rozsahu až 100 bp, a proto jsou jedním z hlavních kandidátů ke zprostředkování FoSTeS (Kim et al. 2016).

## 2.4 MMBIR

### 2.4.1 BIR

Než si popíšeme MMBIR, musíme se nejprve podívat na BIR. BIR jest zkratkou z anglického jazyka pro Break-Induced Replication, což můžeme volně přeložit jako zlomem indukovaná replikace. Jedná se o model pro restartování replikace v zhroucené replikační vidličce, který se vyvinul u kvasinek. Odhaduje se, že se podobný mechanismus může podílet na údržbě telomer v kvasinkách ale i v lidských buňkách (Hastings et al. 2009). Také se předpokládá, že jmenovaný mechanismus se může podílet na strukturních chromosomálních změnách jak u lidí, tak u *E. coli*. Nyní se podíváme na to, jak BIR probíhá (obrázek 4). Vše začíná tím, že helikáza účastníci se replikace při své činnosti narazí na jednovláknový zlom na templátovém vlákně a jedno rameno replikační vidličky se odlomí. Není zde žádný druhý konec, který by se mohl zúčastnit mechanismů pro opravu dvouřetězcových zlomů. Poté je 5' konec ulomeného raménka sestříhnut exonukleázou a vznikne zde 3' přesah. Tento 3' přesah napadne homologní sekvenční, obvykle sesterskou chromatidu. Tato invaze je zprostředkována proteiny RecA/Rad51. 3' konec nasedá na DNA a utvoří se replikační vidlička skládající se z jak z vedoucího, tak opožděujícího se vlákna. Tato replikace má malou procesivitu a prodlužované raménko je odděleno od sesterské chromatidy. Této separace může být dosaženo pomocí migrace Hollidayova spojení. 3' konec znovu invaduje a proces je tak opakován. Po několika cyklech je mechanismus více procesivní a replikace pokračuje až do konce chromosomu nebo ke konci replikonu. Změna procesivity je ovlivněna změnou zúčastněné polymerázy (Lydeard et al. 2007).

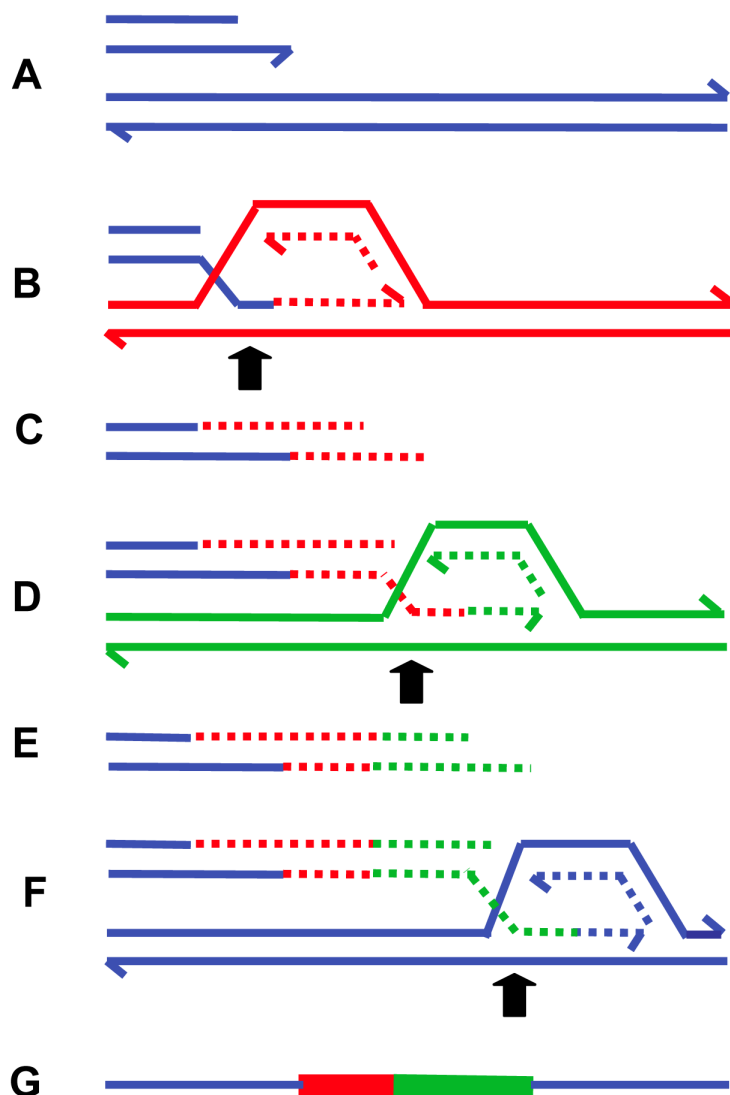


**Obrázek 4:** Průběh BIR. **A** Během replikace ke vzniku jednořetězcového zlomu (označen černou šipkou). **B** Dojde k odlomení jednoho ramene replikační vidličky. **C** Následuje odstříhnutí 5' konce. **D** Nyní dojde k invazi 3' konce a vytvoření D-smyčky. **E** V D-smyčce dojde k obnově replikace vedoucího i opožděného vlákna. **F** Pomocí migrace Hollidayova spojení nebo helikázové aktivity dojde k separaci nově prodlouženého konce. **G** Znovu dojde k sestříhnutí 3' konce a jeho invazi sesterské chromatidy a obnovení replikace. **H** Replikace může pokračovat až do konce chromozomu. **I** Upraveno podle (Hastings et al. 2009)

#### 2.4.2 MMBIR

BIR je obvykle přesný proces, protože opakované invaze proteinů RecA/Rad51 jsou ovlivněny a zprostředkovávány dlouhými homologními sekvencemi DNA. Pro *E. coli* je vyžadována homologie okolo 50 bp (Lovett et al. 2002) a u eukaryot ještě více (Liskay et al. 1987). Toto ale nesedí v případě mikrohomologních spojení. Hastings předpokládá, že v těchto případech jsou replikační vidličky utvořeny nezávisle na RecA/Rad51 (Hastings et al. 2009). Rad51 nezávislá BIR se vyskytuje u kvasinek s mnohem nižší účinností, než BIR s působícím Rad51. Přítomnost neobvyklých struktur jako invertovaných repetit, vede ke zvýšení frekvence výskytu BIR (VanHulle et al. 2007). Rekombinace telomer dokáže probíhat i v nepřítomnosti telomerázy a Rad51. Tato rekombinace je zprostředkována velmi krátkými homologiiemi (Le et al. 1999). Fakt, že telomerázová rekombinace probíhá pomocí BIR, je podložen ověřením, že stejný set enzymů je potřeba k jeho uskutečnění jak ve středu chromosomu, tak v telomerách (Lydeard et al. 2007). Absence či nedostatek RecA/Rad51 může jednoduše nastat v případě stresovaných buněk. Také se ukázalo, že mikrohomologií zprostředkovaná segmentální duplikace v kvasinkách vzniká pomocí BIR a je k tomu potřeba

pol32 (Payen et al. 2008). MMBIR se dá u savců nalézt po rozpadnutí replikační vidličky, protože je zde pouze jeden samostatný konec, který nemá kam být zaligován (Saleh-Gohari et al. 2005). Popis mechanismu najdeme i v obrázku 5. Hastings proto navrhuje, že MMBIR je mechanismem, který slouží k opravě jednoho samostatného dvouvláknového zlomu, kde jsou přístupné úseky jednovláknové DNA a sdílejí mikrohologii s 3' jednovláknovou DNA z rozpadlé replikační vidličky (Hastings et al. 2009). Jsou čtyři možnosti, jakými se jednovláknová DNA může objevit v replikačních vidličkách. První možností je pozastavení transkripčního komplexu v úseku excizních oprav. Dále díky sekundárním strukturám DNA jako jsou vlásenky a křížové struktury. A mezi poslední možnosti patří výskyt jednovláknové DNA v oblastech replikačních počátků a promotorových oblastech. Rozsah většiny templátových oblastí zabraňuje replikačnímu sklouznutí uvnitř jedné replikační vidličky. Schopnost každé jednovláknové DNA, sdílejší mikrohologii s jednovláknovým 3' koncem, účastnit se tohoto mechanismu, vysvětluje, proč je MMBIR tak nepřesné a vede k chromosomálním strukturním změnám (Hastings et al. 2009). Přítomnost invertovaných repetitív může vytvářet vlásenkové smyčky, které odhalují jednovláknové sekvence (Stankiewicz et al. 2003). Navíc mohou vlásenkové struktury zvýšit pravděpodobnost pozastavení replikace, což může následně iniciovat BIR. Sekundární struktury mají tedy významnou roli v generování chromosomálních přestaveb (Hastings et al. 2009).



**Obrázek 5:** Průběh MMBIR. Obrázek znázorňuje přepínání do jiných genomových pozic, ty jsou odlišeny různými barvami. Oblasti mikrohomiologií, které tento přechod zprostředkovávají jsou znázorněny černou šipkou. **A** Nově vzniklá zkolabovaná replikační vidlička. **B** Vznik nové nízko procesivní replikační vidličky. **C** Disociace. **D** Opětovný vznik replikační vidličky a disociace **E** v jiné oblasti DNA. **F** Návrat replikace na původní chromatidu. **G** Vzniklý produkt obsahující sekvence z jiných genomových regionů. Upraveno podle (Hastings et al. 2009)

### 2.4.3 Regulace BIR a MMBIR

Přepínání mezi opravami řízenými mikrohomiologiemi a spolehlivějšími homologiemi řízenými opravami ovlivňuje množství proteinu Rad51. Rad51 vzniká při stresové reakci buněk. Ve výzkumu bylo dokázáno, že hypoxie v nádorovém mikroprostředí vede ke genetické nestabilitě a také, že hypoxie vede k represí Rad 51 a BRCA1 (Bindra et al. 2004). A také k redukci homologní rekombinace (Huang et al. 2007). Máme zde tedy přepínač mezi přesnou homologní rekombinací a méně přesným NHEJ, hlavní roli v přepínání mezi těmito mechanismy má stres (Bindra et al. 2004). V rozpadlých replikačních vidličkách,



kde se NHEJ nemůže uskutečnit nalézáme místo pro BIR. Důležité ale je, že kvůli nedostatku Rad51 se BIR ubírá cestou nezávislou na Rad51, která potřebuje i menší úseky homologie, než Rad51 řízená dráha, jak bylo pozorováno u kvasinek (Le et al. 1999). Hastings (Hastings et al. 2009) se domnívá, že Rad52 je zodpovědný za katalýzu annealingu při MMBIR. Rad52 je nezbytný pro jednovláknový annealing, protože vymaže sekvence mezi přímými repetitivy a annealuje jednovláknovou DNA *in vitro* (Mortensen et al. 1996). Chromosomální přestavby v kvasinkách, jež mají mikrohomologii ve spojích mohou vznikat v nepřítomnosti Rad51, ale vyžadují Rad52 (Tsukamoto et al. 1996). V jednom z případů bylo nalezeno přepínání asociované mikrohomologním spojením mezi Rad51 nezávislou a Rad52 závislou dráhou, které produkují translokace a inverze v místech vysoce divergovaných genů. Autoři si myslí, že takto vzniklá přestavba je výsledkem přepínání templátu během BIR (Schmidt et al. 2006). *In vitro* Rad51 inhibuje jednovláknový annealing aktivitu Rad52 (Wu et al. 2008, s. 51). Absence Rad51 může tedy ovládat toto přepínání mezi invazí vlákna a jeho annealingem. Zjistilo se také, že vznik segmentálních duplikací pomocí mikrohomologií řízené Rad51 nezávislé cesty je i Rad52 nezávislá (Payen et al. 2008). Rad52 není také potřeba k mikrohomologií řízenému spojování konců (Lee a Lee 2007). Závěrem se Hastings domnívá, že kvůli stresu se sníží množství dostupného Rad51 načež hladina Rad52 se nemění. To vede k snížení počtu homologních interakcí a zavedení annealingu jednovláknové DNA jako hlavního mechanismu dostupného pro opravy zhroucené replikační vidličky. Klasické BIR bude tedy redukováno a MMBIR ho bude nahrazovat (Hastings et al. 2009).

### **3. Klinické souvislosti**

#### **3.1 Druhy přestaveb**

##### **3.1.1 Rekurentní přestavby**

Rekurentní přestavby jsou přestavby, které se se znovu objevují na stejném místě u různých pacientů. Rozsahy těchto přestaveb jsou většinou stejné a také sdílejí stejné klastry bodů zlomu. Za první objevený mechanismus, který dával vzniknout rekurentním přestavbám, můžeme považovat NAHR (Stankiewicz a Lupski 2002).

##### **3.1.2 Nerekurentní přestavby**

Nerekurentní přestavby můžeme popsat jako přestavby, které se liší svým rozsahem, což je způsobeno rozdílnými body zlomu. Liší se tedy velikostí, ale sdílejí SRO neboli smallest region of overlap, což v překladu znamená nejmenší oblast překryvu. SRO je podobná mezi

pacienty se stejnými klinickými projevy. Důležitým mechanismem vzniku nerekurentních přestaveb je proto NHEJ (Gu et al. 2008). Nerekurentní přestavby vznikají i pomocí MMBIR a FoSTeS (Seo et al. 2020).

### **3.1.3 Komplexní přestavby**

S vývojem přesnějších metod došlo odhalení oblastí, které měly svoji komplexitu na vyšší úrovni. Tato komplexita se vyznačovala výskytem alespoň tří bodů zlomu a výměnou genetického materiálu mezi dvěma a více chromosomy (Pai et al. 2008). Jak se časem ukázalo, mnoho těchto komplexních přestaveb mělo souvislost s genetickými chorobami. Hlavními mechanismy zodpovědnými za vznik těchto přestaveb by měly být založeny na replikaci DNA (Colnaghi et al. 2011). Mechanismy generující komplexní přestavby jsou proto FoSTeS a MMBIR.

## **3.2 Příklady přestaveb vzniklých pomocí sledovaných mechanismů**

### **3.2.1 NAHR**

Jak již víme, NAHR dokáže generovat duplikace, delece, inverze a translokace. Nyní se zkusíme podívat na chování jednotlivých přestaveb. Následkem takovýchto mutací, pokud se v postižených oblastech bude nacházet nějaký gen citlivý na svůj počet kopií v organismu může být genetická porucha (Colnaghi et al. 2011). Jako příklad se dá uvést DiGeorgův veleokardiofaciální syndrom. Pacienti s tímto syndromem běžně sdílejí 3 Mb nebo vzácnější 1,5 Mb deleci na chromosomu 22q11.2, tyto delece jsou způsobeny rekombinací mezi LCR oblastmi LCR22-2 a LCR22-4 nebo LCR22-3A a LCR22-4 (McDermid a Morrow 2002). Běžně se tedy setkáváme s tím, že NAHR pomocí delece vyvolá nedostatečnost nebo duplikací zvýšení genové dóze (Veitia a Birchler 2010). V určitých případech mohou tyto přestavby vést k jiným výsledkům než ke změně dóze genů. Může také dojít ke genové fúzi nebo k přerušení genu. Což pak může vést k odhalení recesivní alely, která by normálně nebyla přepisována a použita v případě nepoškozenosti původní alely (Coman a Gardner 2007).

Zajímavým fenoménem je objevování reciprokých chorob. Pokud máme nějaký deleční syndrom, lze k němu často nalézt syndrom duplikační. Takto je tomu například u Potocki Lupskiho syndromu, což je duplikační syndrom vzniklý duplikací v oblasti 17p11.2-p11.2, jehož protějškem je Smith-Magenisův syndrom, který je vyvolán delecí ve stejné oblasti (Ricard et al. 2010). Toto pravidlo ale nelze aplikovat pokaždé, protože například intrachromatidové NAHR může vyústit jen a pouze v deleci a nelze tedy hledat jejich

duplikační protějšky. Zajímavé také je, že většinou mají duplikační syndromy mírnější projevy než syndromy delecí. Je zde asi nastavena vyšší tolerance na nadprodukcí a její následné klinické projevy (Menten et al. 2006). Pomocí známých podmínek pro uskutečnění NAHR, lze také hledat místa dalších delecí či duplikací. V blízkosti již známých míst pro NAHR se můžeme vydat hledat další blízké LCR oblasti mezi kterými by mohlo také dojít k NAHR (Sharp et al. 2006).

### 3.2.2 NHEJ

Příkladem přestavby způsobené pomocí NHEJ jsou 2 delecí Xq22 pro protein PLP1. Tato mutace vyvolává Pelizeus-Merzbacherovu chorobu. Na spoji těchto delecí byly nalezeny úseky DNA neznámého původu o délce 12 a 34 bp. Oba vzdálenější zlomy se přitom nalézaly v LCR oblasti známé jako PMDB LCR (Inoue et al. 2002). Jako druhý příklad lze uvést dvě nerekurcentní delecí, způsobující Smith-Magenisův syndrom, které nejspíše vznikly také pomocí NHEJ. Blíže zlomy obou delecí se nacházejí v LCR oblasti SMS-REP. Jedna se nalézá v MER5B transpozonu, který můžeme také nalézt v SMS-REP. Druhá je v blízkosti MIR3 elementu a L2 LINE sekvencí. Vzdálenější zlom druhé delecí nalezneme mezi LIMC4 LINE elementem a *AluSc* elementem (Shaw a Lupski 2005).

### 3.2.3 FoSTeS

Pro přestavby vzniklé pomocí FoSTeS si můžeme všimnout dvou znaků, které jsou pro tyto přestavby typické. Prvním znakem je sekvenční komplexita a druhou podobností jsou mikrohomologie, které nacházíme v místě spojů. U lidských komplexních přestaveb nelze poznat, jestli intermediát během výměny templátů byl jedno nebo dvou vláknová DNA (Zhang et al. 2009). Zdá se také, že FoSTeS nemusí stát jen za komplexními přestavbami, ale i za menšími přestavbami postihující jeden gen či dokonce exon. Tyto jednoduché přestavby jsou generovány, pokud k výměně templátu dojde pouze jednou během celého procesu (Zhang et al. 2009). Přestavbu vzniklou pomocí FoSTeS můžeme najít v oblasti okolo genu *PLP1* u pacientů s Pelizaeusovou-Merzbacherovou chorobou, zkráceně PMD. Nachází se zde komplexní přestavba, která nejspíše vzniká pomocí FoSTeS, jež zde proběhne třikrát za sebou. Všechny FoSTeS vytvořily v tomto případě duplikaci 3 regionů o rozdílné velikosti. Na rozhraních těchto oblastí byly nalezeny mikrohomologie v rozhraní od 2 do 5 bp (Lee et al. 2007). Má se za to, že se pomocí jednonásobného FoSTeS dají vysvětlit například i tandemové duplikace v *PLP1* a *LMNB* regionu (Woodward et al. 2005; Padiath et al. 2006).

### 3.2.4 MMBIR

Pomocí MMBIR může vzniknout také široká škála přestaveb. Translokace vznikne, pokud dojde k přepnutí na jiný chromosom. K duplikaci dojde, pokud přepneme na sesterskou chromatidu nebo homolog za pozicí, ve které zkolabovala replikace. Naopak k delecí dojde, pokud mechanismus přepne na sesterskou chromatidu nebo homolog před pozicí, ve které zkolabovala replikace. K triplikaci dojde, pokud k přeskočení dojde na již replikovanou část. a nakonec je také možno přepnout se na pozici za rozpadlou replikační vidličkou na stejné molekule a tím iniciovat replikaci podobnou mechanismu valivé kružnice. Pokud dojde k přepnutí na invertovanou sekvenci vznikne nám také invertovaný segment (Hastings et al. 2009).

Tento mechanismus může ovlivnit lidský genom na několika úrovních. Na buněčné úrovni se může účastnit procesů spojených s rakovinným bujením. Na organismální úrovni má určitě vliv na variaci počtu kopií různých úseků DNA a stejně tak je schopen produkovat LCR oblasti, které mohou být využity NAHR u příštích generací (Hastings et al. 2009). Poslední úroveň je úroveň druhová, kde se dá předpokládat, že vyšší genomová komplexita, vede k vyšší pravděpodobnosti vzniku sekundárních struktur, které zároveň zvyšují pravděpodobnost pro MMBIR. Takto může docházet k nárůstu komplexity v čase (Dumas et al. 2007).

### 3.2.5 Parkinsonova nemoc a gen *SNCA*

Dalším příkladem, kdy se genomové přestavby podílí na vzniku onemocnění je Parkinsonova nemoc. Přibližně 10 % případů Parkinsonovy nemoci má genetickou příčinu a byly identifikovány geny, které nemoc způsobují (Cook Shukla et al. 1993). Jedním z těchto genů je *SNCA*, který je odpovědný za autosomálně dominantní Parkinsonovu nemoc (Polymeropoulos 1997). Prvně byly s nemocí spjaty *missense* mutace *SNCA*, ale později se ukázalo, že i několikrát duplikovaný *SNCA* je častějším důvodem vzniku nemoci (Tan et al. 2019). Původně se myslelo, že tyto duplikace vznikají pomocí NAHR, vzhledem k velkému počtu repetitivních sekvencí v okolí *SNCA* (Cardoso et al. 2016). Tuto skutečnost se rozhodla ověřit skupina Soo Hyun Sea. Ve své studii dokázali vyvrátit původní domněnku o vzniku duplikací pomocí NAHR, protože nenalezli žádné homologie v okolí bodů zlomu. Místo toho našli mikrohologie uvnitř vlásenkové struktury. Předpokládají, že tento náález podporuje tezi, že duplikace genu *SNCA* je způsobena replikačním mechanismem jako je FoSTeS nebo MMBIR, kdy dojde k zastavení replikace díky vlásence a následnému přesunu replikace na jiné místo, kvůli přítomné mikrohologii (Seo et al. 2020).

## 4. Společná místa vzniku a jejich vliv na mechanismy

### 4.1 Mikrohomologie

Mikrohomologie hrají určitou roli v každém ze zmíněných mechanismů. Jsou to krátké úseky DNA se shodnou sekvencí nukleotidů.

Podmínkou pro uskutečnění NAHR je výskyt LCR oblastí. LCR oblasti jsou opakující se bloky duplikovaných pseudogenů nebo repetitivní DNA (Stankiewicz a Lupski 2002). Mezi těmito oblastmi nalezneme určité spousty homologií i mikrohomologií, vzhledem k povaze jejich vzniku. Také ještě připomenou MEPS, což je úsek v LCR, který čím je si podobnější mezi dvěma LCR, tím je větší pravděpodobnost vzniku NAHR. MEPS pro lidskou meiózu se pohybují v délkovém rozsahu 300–500 bp, to bylo stanoveno empiricky podle pacientů s CMT1A/HNPP (Reiter et al. 1998). Mitotické NAHR se ukázalo, že má i menší požadavky na délku shodné sekvence. Skupina Steinmann ukázala, že devět somatických *NFI* delecí, bylo zprostředkováno homologií o délce kratší než 114 bp (Steinmann et al. 2007). Dále je zde příklad lidských alfa-globinů, kde Lam a Jeffreys našli jak meiotické, tak mitotické NAHR, které je závislé na shodném úseku kratším, než 50 bp (Lam a Jeffreys 2006). Každá takováto přestavba má tedy své individuální požadavky na délku MEPS pro její efektivní uskutečnění. Délka homologie má tedy vliv na efektivitu uskutečnění přestavby.

NHEJ v se během procesu spojování dvou konců DNA k sobě spoléhá na výskyt mikrohomologie. Tato mikrohomologie je buď přítomna rovnou ve dvouvláknovém zlomu nebo je vytvořena pomocí enzymů, podílejících se na NHEJ. Délka této mikrohomologie nám ovlivní, jaký způsob využije buňka pro opravu daného zlomu. K NHEJ dojde v případě, že není přítomna žádná mikrohomologie nebo je zde mikrohomologie o délce od 1 do 4 bp. Další mechanismus, který se podílí na opravě dvouřetězcových spojů je schopen pracovat s mikrohomologiemi v rozsahu od 2 do 20 bp (Saito et al. 2016). Jedná se o MMEJ, což je mikrohomologií zprostředkované spojování konců, také se dá nalézt jako a-EJ (alternativní spojování konců). A při výskytu homologie v rozsahu větším než 20 bp organismy využívají SSA (single-strand annealing).

FoSTeS je mechanismus vzniku komplexních a nerekurentních přestaveb, který mikrohomologie využívá k znovuoobnovení replikace. Mikrohomologie slouží jako primer mezi původní replikační vidličkou a novým templátem (Lee et al. 2007). Délka této mikrohomologie se dle nalezených případů pohybuje od 1 až ke 40 bp (Zhang et al. 2009).

MMBIR zvládne na rozdíl od BIR, které je závislé na Rad51 rekombináze, jež vyžaduje homologii o délce 70-100 bp, pracovat i s mikrohomologiemi kratšími než 25 bp.

Mikrohomologie zde jako u FoSTeS slouží jako primer mezi templátem a opravovaným místem. Také jako FoSTeS může se stát, že bude docházet k opakované disociaci a invazi podle jiných mikrohomologií. Toto je nejspíše způsobeno nízkou procesivitou DNA polymerázy na začátku opravného procesu (Lydeard et al. 2007).

## **4.2 Dvouvláknové zlomy**

Jejich základní roli jsme si již zodpověděli v první části, nyní se ale podíváme na porovnání napříč zmíněnými mechanismy. Podíváme se tedy na roli dvouvláknových zlomů u NAHR. Jak již bylo uvedeno NAHR typicky probíhá mezi dvěma LCR oblastmi (Stankiewicz a Lupski 2002). Také víme, že rekombinace mezi určitými LCR oblastmi probíhá častěji než u jiných. Preferované LCR oblasti pro NAHR se nacházejí v blízkosti míst, kde nalezneme struktury schopné vytvořit dvouvláknové zlomy. Mezi tyto struktury patří minisatelity, transpozony a palindromy. (Lupski 2004). Toto tvrzení bylo založeno na sekvenční analýze, která potvrdila blízkost NAHR hot-spotů s těmito strukturami (Reiter et al. 1998). Dále se můžeme opřít o výzkum (Roychowdhury a Abyzov 2019), kteří zkoumali vztah dvouřetězcových zlomů a NAHR. Jejich výzkum indikuje, že většina NAHR probíhajících v pohlavních buňkách, může být chybou homologních oprav iniciovaných spontánně vzniklým dvouřetězcovým zlomem. Toto tvrzení založili na vysokém stupni korelace výskytu NAHR a dvouřetězcových zlomů, ale i nízkým stupněm asociace NAHR s rekombinačními hot spoty (Roychowdhury a Abyzov 2019). Může zde být tedy spojitost, která vede k preferenci určitých LCR oblastí, kvůli okolním strukturám generujícím dvouvláknové zlomy. Dvouvláknové zlomy by tedy mohly nějakým způsobem pomoci lépe iniciovat NAHR. U kvasinek lze nalézt shodu mezi rekombinačními hot-spoty a vznikem dvouvláknových zlomů. Meiotické dvouvláknové zlomy se vyskytují v místech, kde dochází u kvasinek k rekombinaci (Baudat a Nicolas 1997).

U NHEJ je souvislost s dvouvláknovými zlomy zřejmá, jelikož je to mechanismus, který slouží k jejich odstranění. NHEJ je tedy na existenci dvouvláknových zlomů přímo závislý a bez jejich existence nemůže probíhat.

U FoSTeS se nenašla žádná korelace mezi dvouvláknovými zlomy a jeho výskytem. Jedná se spíše o replikační omyl než akci vyvolanou dvouvláknovým zlomem.

MMBIR již ale najdeme souvislost se dvouvláknovým zlomem. Dvouvláknový zlom zde vzniká po rozbití replikační vidličky. Znovu připomenou, že po rozbití replikační vidličky je zde pouze jeden dvouvláknový zlom, který nemá svůj druhý konec, jako je tomu například u poškození ionizačním zářením. Nelze tedy k jeho opravě využít NHEJ (Saleh-Gohari et al. 2005). Tento dvouvláknový zlom vzniká při replikaci, když replikační vidlička narazí na nick na templátu. Vzniká tedy pokud využijeme pro replikaci nevhodný templát (Hastings et al. 2009).

Rozhodnutí, jakou cestou se má vydat buňka při opravě dvouřetězcového zlomu, závisí na třech proměnných. Nesmíme ještě zapomenout na klasickou homologní rekombinaci (HR). První proměnnou je, v jakém stavu jsou konce ohraničující zlom, druhou proměnnou jest fáze buněčného cyklu a třetí je množství a typ regulačních proteinů, které se momentálně v buňce nalézají (Ottaviani et al. 2014). Ve fázi G1 jsou MMEJ a HR omezovány nízkou koncentrací CtIP (oproti ostatním fázím buněčného cyklu) a také inhibicí již dostupného množství CtIP pomocí fosforylovaného histonu H2AX, který rekrutuje MDC1 na chromatin okolo zlomu. MDC1 přímo inhibuje CtIP. (Buis et al. 2012, s. 11; Stucki et al. 2005). Takto neresektované konce mají vysokou afinitu ke komplexu Ku70/Ku80, který tak chrání konce před nukleolytickou degradací a připravuje na NHEJ (Ottaviani et al. 2014).

Ve fázích G2, M a S buněčného cyklu je resekce DNA efektivnější kvůli dostatku CtIP a také potlačení inhibujících proteinů jako H2AX a MDC1. NHEJ tedy v těchto fázích neprobíhá tak běžně (Buis et al. 2012; Stucki et al. 2005). Stále ale může oprava proběhnout i homologní rekombinací. MMEJ si vystačí s resekci, kterou zvládnou provést MRN a CtIP, kdežto HR potřebuje, aby byly konce upraveny pomocí helikázy BLM a exonukleázy Exo1 (Truong et al. 2013).

Krátké mikrohologie okolo zlomu mohou využít jak MMEJ, tak NHEJ a není jasné určeno, který mechanismus se z tohoto hlediska uplatní. Nezapomínejme, že NHEJ je schopno opravit zlomy i bez mikrohologií, což se o MMEJ říct nedá (Lieber 2010). Na druhou stranu výhodou MMEJ je nezávislost na Ku a DNA ligáze IV/XRCC4 (Bennardo et al. 2008). Funkční studie také odhalily, že MMEJ je schopno fungovat paralelně i v případě aktivního NHEJ (Lee-Theilen et al. 2011). Můžeme si ještě všimnout, že MMEJ vyžaduje pár proteinů, které jsou vyžadovány také k provedení homologní rekombinace (Heyer et al. 2010). HR ale potřebuje delší homologní sekvence a také fosforylaci CtIP, která je klíčová pro asociaci s komplexem BRCA1 a MRN. MMEJ takovou fosforylaci nevyžaduje (Yun a Hiom 2009).

### **4.3 Struktury schopné zastavit replikaci**

Ze zmíněných mechanismů budou mít tyto struktury vliv hlavně na replikační mechanismy FoSTeS a MMBIR. Jednou z významných struktur, které jsou schopny pozastavení replikační vidličky jsou mikrosatelity. Tyto oblasti jsou náchylné k pozastavení replikace nebo rozbití replikační vidličky (Leffak 2017). Prvním důvodem je tendence formovat nekanonické struktury, které narušují chromosomovou stabilitu (Carr a Lambert 2013). Dalším důvodem je pravděpodobnost náhodného homologii řízeného a opakovaného misalignmentu mezi mikrosatelity sesterských chromatid během invaze vlákna. Další strukturou, jež je schopna pozastavit replikaci je R-loop a také vazba proteinů na DNA (Leffak 2017). A nakonec i vlásenkové struktury na specifických místech mohou vést k zastavení replikace (Seo et al. 2020).



**Tabulka 1:** Přehled mechanismů

Charakteristika	NAHR	NHEJ	FoSTeS	MMBIR
Typ mechanismu	Rekombinační, Reparační	Reparační	Replikační	Replikační, Reparační
Typ vznikajících přestaveb	Rekurentní	Nerekurentní	Komplexní, Nerekurentní	Komplexní, Nerekurentní
Způsobované přestavby	Duplikace, Delece, Inverze, Translokace	Delece, Duplikace	Duplikace, Delece, Inverze, Translokace	Duplikace, Triplikace, Delece, Inverze, Translokace
Podmínky uskutečnění	LCR ve vhodné orientaci, přítomnost dvouvláknového zlomu	Vznik dvouvláknového zlomu a mikrohomologie	Zaseknutí replikační vidličky a blízkost dalšího místa replikace	Zaseknutí replikační vidličky a vznik zlomu
Místa působení	Tandemové repetice	Dvouvláknové zlomy	Repetitivní sekvence	Zhroucená replikační vidlička
Vliv mikrohomologie	V MEPS má vliv na účinnost mechanismu	Běžná délka 1 až 4 bp, jsou i případy bez mikrohomologie	Slouží k hybridizaci fragmentů	Vyžadovány k opravě a hybridizaci templátu
Vliv dvouvláknových zlomů	Nalézají se poblíž rekombinačních hot-spotů	Esenciální	Bez vlivu	Vzniká po zhroucení replikace
Vliv struktur zastavujících replikaci	Bez vlivu	Bez vlivu	Způsobují zastavení replikace umožňující průběh mechanismu	Způsobují zastavení replikace umožňující průběh mechanismu

## 5. Závěr

Tato práce slouží jako přehled vlastností a charakteristika mechanismů způsobující genomové přestavby. NAHR je mechanismus generující rekurentní přestavby působící zejména v LCR oblastech a způsobuje duplikace, delece, inverze a translokace v závislosti na umístění a orientaci LCR. Velký vliv na NAHR má výskyt dvouřetězcových zlomů, které se často vyskytují poblíž míst, které NAHR podstupují.

NHEJ je reparační mechanismus sloužící k opravě dvouvláknových zlomů, schopen bez templátu zacelit širokou škálu dvouřetězcových zlomů pomocí rozsáhlé enzymové mašinerie. Přestavby vznikající touto cestou mají nerekurentní charakter. Jde zejména o delece a duplikace. U oprav dvouřetězcových zlomů ovlivňuje délka mikrohomologií výběr mechanismu, pomocí něhož dojde k opravě.

FoSTeS je replikační mechanismus, schopen vytvořit komplexní i nerekurentní přestavby. Je schopen generovat duplikace, delece, inverze a translokace. K FoSTeS dochází často v oblastech, kde se vyskytuje struktura schopná zastavit replikaci a zároveň je blízko místo další replikace s vhodnou mikrohomologií, díky níž může vlákno DNA z pozastavené replikační vidličky přeskočit. Tento jev se může několikrát opakovat, a tak dát vzniku komplexní přestavbě.

MMBIR je replikační mechanismus, který také působí v místech pozastavené replikace a generuje dvouvláknový zlom, který má pouze jeden konec. Následně dochází k přeskokům do jiných oblastí genomu podle mikrohomologií. Nakonec dojde k návratu replikace do původní oblasti. Mechanismem vznikají duplikace, triplikace, delece, inverze a translokace.

Všechny mechanismy stojí za vznikem různých genetických chorob a porozumění jejich průběhu hraje důležitou roli v hledání účinné léčby. Musí se ovšem hledat kompromisy, protože jejich úplné vyřazení má negativní důsledky na organismus. S rozvojem sekvenovacích technik dosáhneme přesnějších dat ohledně genomové architektury, která má na všechny mechanismy nemalý vliv. Toto téma je určitě zajímavým polem výzkumu a s vhodným využitím editačních technik budeme schopni časem pomoci široké škále pacientů.

## 6. Přehled použité literatury

AHEL, Ivan, Ulrich RASS, Sherif F. EL-KHAMISY, Sachin KATYAL, Paula M. CLEMENTS, Peter J. MCKINNON, Keith W. CALDECOTT a Stephen C. WEST. The neurodegenerative disease protein aprataxin resolves abortive DNA ligation intermediates. *Nature* [online]. 2006, **443**(7112), 713-716 [cit. 2020-05-27].

AHMAD, Anwaar, Andria Rasile ROBINSON, Anette DUENSING, Ellen van DRUNEN, H. Berna BEVERLOO, David B. WEISBERG, Paul HASTY, Jan H. J. HOEIJMAKERS a Laura J. NIEDERNHOFER. ERCC1-XPF Endonuclease Facilitates DNA Double-Strand Break Repair. *Molecular and Cellular Biology* [online]. 2008, **28**(16), 5082-5092 [cit. 2020-05-27].

ARNOULT, Nausica, Adriana CORREIA, Jiao MA, Anna MERLO, Sara GARCIA-GOMEZ, Marija MARIC, Marco TOGNETTI, Christopher W. BENNER, Simon J. BOULTON, Alan SAGHATELIAN a Jan KARLSEDER. Regulation of DNA repair pathway choice in S and G2 phases by the NHEJ inhibitor CYREN. *Nature* [online]. 2017, **549**(7673), 548-552 [cit. 2020-05-27].

BAILEY, Jeffrey. A., Segmental Duplications: Organization and Impact Within the Current Human Genome Project Assembly. *Genome Research* [online]. **11**(6), 1005-1017 [cit. 2020-05-27].

BARBOUTI, Aikaterini, Pawel STANKIEWICZ, Chad NUSBAUM, Christina CUOMO, April COOK, Mattias HÖGLUND, Bertil JOHANSSON, Anne HAGEMEIJER, Sung-Sup PARK, Felix MITELMAN, James R. LUPSKI a Thoas FIORETOS. The Breakpoint Region of the Most Common Isochromosome, i(17q), in Human Neoplasia Is Characterized by a Complex Genomic Architecture with Large, Palindromic, Low-Copy Repeats. *The American Journal of Human Genetics* [online]. 2004, **74**(1), 1-10 [cit. 2020-05-27].

BAUDAT, Frédéric a Alain NICOLAS. Clustering of meiotic double-strand breaks on yeast chromosome III. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 1997, **94**(10), 5213-5218 [cit. 2020-05-27].

BAUTERS, Marijke, Hilde VAN ESCH, Michael J. FRIEZ, Odile BOESPFLUG-TANGUY, Martin ZENKER, Angela M. VIANNA-MORGANTE, Carla ROSENBERG, Jaakko IGNATIUS, Martine RAYNAUD, Karen HOLLANDERS, Karen GOVAERTS, Kris VANDENREIJT, Florence NIEL, Pierre BLANC, Roger E. STEVENSON, Jean-Pierre FRYNS, Peter MARYNEN, Charles E. SCHWARTZ a Guy FROYEN. Nonrecurrent MECP2 duplications mediated by genomic architecture-driven DNA breaks and break-induced replication repair. *Genome Research* [online]. 2008, **18**(6), 847-858 [cit. 2020-05-27].

BEBENEK, Katarzyna, Lars C. PEDERSEN a Thomas A. KUNKEL. Structure–Function Studies of DNA Polymerase  $\lambda$ . *Biochemistry* [online]. 2014, **53**(17), 2781-2792 [cit. 2020-05-27].

BENNARDO, Nicole, Anita CHENG, Nick HUANG a Jeremy M. STARK. Alternative-NHEJ Is a Mechanistically Distinct Pathway of Mammalian Chromosome Break Repair. *PLoS Genetics* [online]. 2008, **4**(6) [cit. 2020-05-27].

BERNSTEIN, Nina K., R. Scott WILLIAMS, Melissa L. RAKOVSKY, Diana CUI, Ruth GREEN, Feridoun KARIMI-BUSHERI, Rajam S. MANI, Sarah GALICIA, C. Anne KOCH, Carol E. CASS, Daniel DUROCHER, Michael WEINFELD a J. N. Mark GLOVER. The Molecular Architecture of the Mammalian DNA Repair Enzyme, Polynucleotide Kinase. *Molecular Cell* [online]. 2005, **17**(5), 657-670 [cit. 2020-05-27].

BHARGAVA, Ragini, David O. ONYANGO a Jeremy M. STARK. Regulation of Single-Strand Annealing and its Role in Genome Maintenance. *Trends in Genetics* [online]. 2016, **32**(9), 566-575 [cit. 2020-05-27].

BINDRA, Ranjit S., Paul J. SCHAFFER, Alice MENG, Jennifer WOO, Kårstein MÅSEIDE, Matt E. ROTH, Paul LIZARDI, David W. HEDLEY, Robert G. BRISTOW a Peter M. GLAZER. Down-Regulation of Rad51 and Decreased Homologous Recombination in Hypoxic Cancer Cells. *Molecular and Cellular Biology* [online]. 2004, **24**(19), 8504-8518 [cit. 2020-05-27].

BLOMMERS, Marcel. J., J. A. WALTERS, C. A. HAASNOOT, J. M. AELEN, G. A. VAN DER MAREL, J. H. VAN BOOM a C. W. HILBERS. Effects of base sequence on the loop folding in DNA hairpins. *Biochemistry* [online]. 2002, **28**(18), 7491-7498 [cit. 2020-05-27].

BROUWER, Ineke, Gerrit SITTERS, Andrea CANDELLI, Stephanie J. HEEREMA, Iddo HELLER, Abinadabe J. DE MELO, Hongshan ZHANG, Davide NORMANNO, Mauro MODESTI, Erwin J. G. PETERMAN a Gijs J. L. WUITE. Sliding sleeves of XRCC4–XLF bridge DNA and connect fragments of broken DNA. *Nature* [online]. 2016, **535**(7613), 566-569 [cit. 2020-05-27].

BUIS, Jeffrey, Trina STONEHAM, Elizabeth SPEHALSKI a David O. FERGUSON. Mre11 regulates CtIP-dependent double-strand break repair by interaction with CDK2. *Nature Structural & Molecular Biology* [online]. 2012, **19**(2), 246-252 [cit. 2020-05-27].

CARDOSO, Ana R., Manuela OLIVEIRA, Antonio AMORIM a Luisa AZEVEDO. Major influence of repetitive elements on disease-associated copy number variants (CNVs). *Human Genomics* [online]. 2016, **10**(1) [cit. 2020-05-27].

CARR, Antony M. a Sarah LAMBERT. Replication Stress-Induced Genome Instability: The Dark Side of Replication Maintenance by Homologous Recombination. *Journal of Molecular Biology* [online]. 2013, **425**(23), 4733-4744 [cit. 2020-05-27].

CARVALHO, Claudia M. B. a James R. LUPSKI. Copy number variation at the breakpoint region of isochromosome 17q. *Genome Research* [online]. 2008, **18**(11), 1724-1732 [cit. 2020-05-27].

COLNAGHI, Rita, Gillian CARPENTER, Marcel VOLKER a Mark O'DRISCOLL. The consequences of structural genomic alterations in humans: Genomic Disorders, genomic instability and cancer. *Seminars in Cell & Developmental Biology* [online]. 2011, **22**(8), 875-885 [cit. 2020-05-27].

COMAN, David J. a R.J.McKinlay GARDNER. Deletions Revealing Recessive Genes: Deletions that reveal recessive genes. *European Journal of Human Genetics* [online]. 2007, **15**(11), 1103-1104 [cit. 2020-05-27].

COOK SHUKLA, Lola, Jeanine SCHULZE, Janice FARLOW, Nathan D. PANKRATZ, Joanne WOJCIESZEK a Tatiana FOROUD. Parkinson Disease Overview. In: Margaret P. ADAM, Holly H. ARDINGER, Roberta A. PAGON, Stephanie E. WALLACE, Lora JH BEAN, Karen STEPHENS a Anne AMEMIYA, ed. *GeneReviews®* [online]. 1993 Seattle (WA): University of Washington, Seattle [cit. 2020-05-27].

COSTANTINI, Silvia, Lisa WOODBINE, Lucia ANDREOLI, Penny A. JEGGO a Alessandro VINDIGNI. Interaction of the Ku heterodimer with the DNA ligase IV/Xrcc4 complex and its regulation by DNA-PK. *DNA Repair* [online]. 2007, **6**(6), 712-722 [cit. 2020-05-27].

CRESPAN, Emmanuele, Tibor CZABANY, Giovanni MAGA a Ulrich HÜBSCHER. Microhomology-mediated DNA strand annealing and elongation by human DNA polymerases  $\lambda$  and  $\beta$  on normal and repetitive DNA sequences. *Nucleic Acids Research* [online]. 2012, **40**(12), 5577-5590 [cit. 2020-05-27].

DARAI-RAMQVIST, Eva, Agneta SANDLUND, Stefan MULLER, George KLEIN, Stefan IMREH a Maria KOST-ALIMOVA. Segmental duplications and evolutionary plasticity at tumor chromosome break-prone regions. *Genome Research* [online]. 2008, **18**(3), 370-379 [cit. 2020-05-27].

DELLA-MARIA, Julie, Yi ZHOU, Miaw-Sheue TSAI, Jeff. KUHNLEIN, James P. CARNEY, Tanya T. PAULL a Alan E. TOMKINSON. Human Mre11/Human Rad50/Nbs1 and DNA Ligase III $\alpha$ /XRCC1 Protein Complexes Act Together in an Alternative Nonhomologous End Joining Pathway. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 2011, **286**(39), 33845-33853 [cit. 2020-05-27].

DUMAS, Laura, Young H. KIM, Anis KARIMPOUR-FARD, Michael COX, Janet HOPKINS, Jonathan R. POLLACK a James M. SIKELA. Gene copy number variation spanning 60 million years of human and primate evolution. *Genome Research* [online]. 2007, **17**(9), 1266-1277 [cit. 2020-05-27].

GOODARZI, Aaron A., Yaping YU, Enriqueta RIBALLO, Pauline DOUGLAS, Sarah A. WALKER, Ruiqiong YE, Christine HÄRER, Caterina MARCHETTI, Nick MORRICE, Penny A. JEGGO a Susan P. LEES-MILLER. DNA-PK autophosphorylation facilitates Artemis endonuclease activity. *The EMBO Journal* [online]. 2006, **25**(16), 3880-3889 [cit. 2020-05-27].

GRAWUNDER, Ulf, Matthias WILM, Xiantuo WU, Peter KULESZA, Thomas E. WILSON, Matthias MANN a Michael R. LIEBER. Activity of DNA ligase IV stimulated by complex formation with XRCC4 protein in mammalian cells. *Nature* [online]. 1997, **388**(6641), 492-495 [cit. 2020-05-27].

GU, Jiafeng, Haihui LU, Brigitte TIPPIN, Noriko SHIMAZAKI, Myron F. GOODMAN a Michael R. LIEBER. XRCC4: DNA ligase IV can ligate incompatible DNA ends and can ligate across gaps. *The EMBO Journal* [online]. 2007, **26**(4), 1010-1023 [cit. 2020-05-27].

GU, Wenli, Feng ZHANG a James R LUPSKI. Mechanisms for human genomic rearrangements. *PathoGenetics* [online]. 2008, **1**(1) [cit. 2020-05-27].

HASTINGS, Philip. J., Grzegorz IRA a James R. LUPSKI. Microhomology-Mediated Break-Induced Replication Model for the Origin of Human Copy Number Variation. *PLoS Genetics* [online]. 2009, **5**(1) [cit. 2020-05-27].

HEYER, Wolf-Dietrich, Kirk T. EHMSSEN a Jie LIU. Regulation of Homologous Recombination in Eukaryotes. *Annual Review of Genetics* [online]. 2010, **44**(1), 113-139 [cit. 2020-05-27].

HUANG, L. Eric, Ranjit S. BINDRA, Peter M. GLAZER a Adrian L. HARRIS. Hypoxia-induced genetic instability—a calculated mechanism underlying tumor progression. *Journal of Molecular Medicine* [online]. 2007, **85**(2), 139-148 [cit. 2020-05-27].

CHANG, Howard H. Y., Nicholas R. PANNUNZIO, Noritaka ADACHI a Michael R. LIEBER. Non-homologous DNA end joining and alternative pathways to double-strand break repair. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* [online]. 2017, **18**(8), 495-506 [cit. 2020-05-27].

CHANG, Howard H. Y., Go WATANABE, Christina A. GERODIMOS, Takashi OCHI, Tom L. BLUNDELL, Stephen P. JACKSON a Michael R. LIEBER. Different DNA End Configurations Dictate Which NHEJ Components Are Most Important for Joining Efficiency. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 2016, **291**(47), 24377-24389 [cit. 2020-05-27].

CHANG, Howard H. Y., Go WATANABE a Michael R. LIEBER. Unifying the DNA End-processing Roles of the Artemis Nuclease. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 2015, **290**(40), 24036-24050 [cit. 2020-05-27].

INOUE, Ken, Hitoshi OSAKA, Virginia C. THURSTON, Joe T. R. CLARKE, Akira YONEYAMA, Lisa ROSENBARKER, Thomas D. BIRD, M. E. HODES, Lisa G. SHAFFER a James R. LUPSKI. Genomic Rearrangements Resulting in PLP1 Deletion Occur by Nonhomologous End Joining and Cause Different Dysmyelinating Phenotypes in Males and Females. *The American Journal of Human Genetics* [online]. 2002, **71**(4), 838-853 [cit. 2020-05-27].

JAYAVARADHAN, Rajeswari, Devin M. PILLIS, Michael GOODMAN, Fan ZHANG, Yue ZHANG, Paul R. ANDREASSEN a Punam MALIK. CRISPR-Cas9 fusion to dominant-negative 53BP1 enhances HDR and inhibits NHEJ specifically at Cas9 target sites. *Nature Communications* [online]. 2019, **10**(1) [cit. 2020-05-27].

KIM, Songmi, Chun-Sung CHO, Kyudong HAN a Jungnam LEE. Structural Variation of Alu Element and Human Disease. *Genomics & Informatics* [online]. 2016, **14**(3) [cit. 2020-05-27].

KOCH, Christine Anne, Roger AGYEI, Sarah GALICIA, Pavel METALNIKOV, Paul O'DONNELL, Andrei STAROSTINE, Michael WEINFELD a Daniel DUROCHER. Xrcc4 physically links DNA end processing by polynucleotide kinase to DNA ligation by DNA ligase IV. *The EMBO Journal* [online]. 2004, **23**(19), 3874-3885 [cit. 2020-05-27].

KONISHI, Akimitsu. a Titia. DE LANGE. Cell cycle control of telomere protection and NHEJ revealed by a ts mutation in the DNA-binding domain of TRF2. *Genes & Development* [online]. 2008, **22**(9), 1221-1230 [cit. 2020-05-27].

LAM, Kwan-Wood G. a Alec J. JEFFREYS. Processes of copy-number change in human DNA: The dynamics of  $\gamma$ -globin gene deletion. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2006, **103**(24), 8921-8927 [cit. 2020-05-27].

LE, Siyuan., J. Kent MOORE, James. E. HABER a Carol. W. GREIDER. RAD50 and RAD51 define two pathways that collaborate to maintain telomeres in the absence of telomerase. *Genetics*. [online]. 1999, **152**(1), 143-152 [cit. 2020-05-27].

LEE, Jennifer A., Claudia M. B. CARVALHO a James R. LUPSKI. LEE, Jennifer A., Claudia M.B. CARVALHO a James R. LUPSKI. A DNA Replication Mechanism for Generating Nonrecurrent Rearrangements Associated with Genomic Disorders. *Cell* [online]. 2007, **131**(7), 1235-1247 [cit. 2020-05-27].

LEE, Jennifer A., Claudia M. B. CARVALHO a James R. LUPSKI. LEE, Jennifer A., Claudia M.B. CARVALHO a James R. LUPSKI. A DNA Replication Mechanism for Generating Nonrecurrent Rearrangements Associated with Genomic Disorders. *Cell* [online]. 2007, **131**(7), 1235-1247 [cit. 2020-05-27].

LEE, Kihoon a Sang Eun LEE. *Saccharomyces cerevisiae* Sae2- and Tel1-Dependent Single-Strand DNA Formation at DNA Break Promotes Microhomology-Mediated End Joining. *Genetics* [online]. 2007, **176**(4), 2003-2014 [cit. 2020-05-27].

LEE-THEILEN, Mieun, Allysia J. MATTHEWS, Dierdre KELLY, Simin ZHENG a Jayanta CHAUDHURI. CtIP promotes microhomology-mediated alternative end joining during class-switch recombination. *Nature Structural & Molecular Biology* [online]. 2011, **18**(1), 75-79 [cit. 2020-05-27].

LEFFAK, Michael. Break-induced replication links microsatellite expansion to complex genome rearrangements. *BioEssays* [online]. 2017, **39**(8) [cit. 2020-05-27].

LI, Sicong, Howard H. CHANG, Doris NIEWOLIK, Michael P. HEDRICK, Anthony B. PINKERTON, Christian A. HASSIG, Klaus SCHWARZ a Michael R. LIEBER. Evidence That the DNA Endonuclease ARTEMIS also Has Intrinsic 5'-Exonuclease Activity. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 2014, **289**(11), 7825-7834 [cit. 2020-05-27].

LIEBER, Michael R. The Mechanism of Double-Strand DNA Break Repair by the Nonhomologous DNA End-Joining Pathway. *Annual Review of Biochemistry* [online]. 2010, **79**(1), 181-211 [cit. 2020-05-27].

LINDSAY, Sarah J, Mehrdad KHAJAVI, James R LUPSKI a Matthew E HURLES. A Chromosomal Rearrangement Hotspot Can Be Identified from Population Genetic Variation and Is Coincident with a Hotspot for Allelic Recombination. *The American Journal of Human Genetics* [online]. 2006, **79**(5), 890-902 [cit. 2020-05-27].

LISKAY, R. Michael., Anthea LETSOU a Janet L. STACHELEK. Homology requirement for efficient gene conversion between duplicated chromosomal sequences in mammalian cells. *Genetics*. [online]. 1987, **115**(1), 161-167 [cit. 2020-05-27].

LOVETT, Susan T., Rebecca L. HURLEY, Vincent A. SUTERA, Rachel H. AUBUCHON a Maria A. LEBEDEVA. Crossing over between regions of limited homology in *Escherichia coli*. RecA-dependent and RecA-independent pathways. *Genetics*. [online]. 2002, **160**(3), 851-859 [cit. 2020-05-27].

LUPSKI, James R. Genomic disorders: structural features of the genome can lead to DNA rearrangements and human disease traits. *Trends in Genetics* [online]. 1998, **14**(10), 417-422 [cit. 2020-05-27].

LUPSKI, James R. Hotspots of homologous recombination in the human genome: not all homologous sequences are equal. *Genome biology* [online]. 2004, **5**(10), 242–242 [cit. 2020-05-27].

LUPSKI, James R. Genomic rearrangements and sporadic disease. *Nature Genetics* [online]. 2007, **39**(S7), S43-S47 [cit. 2020-05-27].

LYDEARD, John R., Suvi JAIN, Miyuki YAMAGUCHI a James E. HABER. Break-induced replication and telomerase-independent telomere maintenance require Pol32. *Nature* [online]. 2007, **448**(7155), 820-823 [cit. 2020-05-27].

MA, Yunmei, Haihui LU, Brigitte TIPPIN, Myron F. GOODMAN, Noriko SHIMAZAKI, Osamu KOIWAI, Chih-Lin HSIEH, Klaus SCHWARZ a Michael R. LIEBER. A Biochemically Defined System for Mammalian Nonhomologous DNA End Joining. *Molecular Cell* [online]. 2004, **16**(5), 701-713 [cit. 2020-05-27].

MCDERMID, Heather E. a Bernice E. MORROW. Genomic Disorders on 22q11. *The American Journal of Human Genetics* [online]. 2002, **70**(5), 1077-1088 [cit. 2020-05-27].

MEEK, Katheryn, Van DANG a Susan P. LEES-MILLER. *Chapter 2 DNA-PK* [online]. Elsevier, 2008, 2008, s. 33-58 [cit. 2020-05-27]. Advances in Immunology.

MENTEN, Bjorn, N. MAAS, B. THIENPONT, Karen BUYSSE, Jo VANDESOMPELE, Cindy MELOTTE, T. DE RAVEL, Steven VAN VOOREN, Irina BALIKOVA, L. BACKX, Sandra JANSSENS, Anne DE PAEPE, Bart DE MOOR, Yves MOREAU, Peter MARYNEN, Jean-Pierre. FRYNS, Geert MORTIER, K. DEVRIENDT, Franki SPELEMAN a J.R. VERMEESCH. Emerging patterns of cryptic chromosomal imbalance in patients with idiopathic mental retardation and multiple congenital anomalies: a new series of 140 patients and review of published reports. *Journal of Medical Genetics* [online]. 2006, **43**(8), 625-633 [cit. 2020-05-27].

MIMORI, Tsuneyo. a Jeff A. HARDIN. Mechanism of interaction between Ku protein and DNA. *The Journal of Biological Chemistry*. [online] 1986 **261**(22), 10375–10379. [cit. 2020-05-27].

MITCH MCVEY a SANG EUN LEE. MMEJ repair of double-strand breaks (director's cut): deleted sequences and alternative endings. *Trends in Genetics* [online]. 2008, **24**(11), 529-538 [cit. 2020-05-27].

MOON, Andrea F, Miguel GARCIA-DIAZ, Katarzyna BEBENEK, Bryan J DAVIS, Xuejun ZHONG, Dale A RAMSDEN, Thomas A KUNKEL a Lars C PEDERSEN. Structural insight into the substrate specificity of DNA Polymerase  $\mu$ . *Nature Structural & Molecular Biology* [online]. 2007, **14**(1), 45-53 [cit. 2020-05-27].

MOON, Andrea F., John M. PRYOR, Dale A. RAMSDEN, Thomas A. KUNKEL, Katarzyna BEBENEK a Lars C. PEDERSEN. Sustained active site rigidity during synthesis by human DNA polymerase  $\mu$ . *Nature Structural & Molecular Biology* [online]. 2014, **21**(3), 253-260 [cit. 2020-05-27].



MORTENSEN, Uffe H., Christian BENDIXEN, Ivana SUNJEVARIC a Rodney ROTHSTEIN. DNA strand annealing is promoted by the yeast Rad52 protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 1996, **93**(20), 10729-10734 [cit. 2020-05-27].

MOSHOUS, Despina, Isabelle CALLEBAUT, Régina DE CHASSEVAL, Barbara CORNEO, Marina CAVAZZANA-CALVO, Françoise LE DEIST, Ilhan TEZCAN, Ozden SANAL, Yves BERTRAND, Noel PHILIPPE, Alain FISCHER a Jean-Pierre DE VILLARTAY. Artemis, a Novel DNA Double-Strand Break Repair/V(D)J Recombination Protein, Is Mutated in Human Severe Combined Immune Deficiency. *Cell* [online]. 2001, **105**(2), 177-186 [cit. 2020-05-27].

NICK MCELHINNY, Stephanie A., Jody M. HAVENER, Miguel GARCIA-DIAZ, Raquel JUÁREZ, Katarzyna BEBENEK, Barbara L. KEE, Luis BLANCO, Thomas A. KUNKEL a Dale A. RAMSDEN. A Gradient of Template Dependence Defines Distinct Biological Roles for Family X Polymerases in Nonhomologous End Joining. *Molecular Cell* [online]. 2005, **19**(3), 357-366 [cit. 2020-05-27].

NICK MCELHINNY, Stephanie A. a Dale A. RAMSDEN. Polymerase Mu Is a DNA-Directed DNA/RNA Polymerase. *Molecular and Cellular Biology* [online]. 2003, **23**(7), 2309-2315 [cit. 2020-05-27].

OCHI, Takashi, Andrew N. BLACKFORD, Julia COATES, Satpal JHUIH, Shahid MEHMOOD, Naoka TAMURA, Jon TRAVERS, Qian WU, Viji M. DRAVIAM, Carol V. ROBINSON, Tom L. BLUNDELL a Stephen P. JACKSON. DNA repair. PAXX, a paralog of XRCC4 and XLF, interacts with Ku to promote DNA double-strand break repair. *Science* [online]. 2015, **347**(6218), 185-188 [cit. 2020-05-27].

OTTAVIANI, Diego, Magdalena LECAIN a Denise SHEER. The role of microhomology in genomic structural variation. *Trends in Genetics* [online]. 2014, **30**(3), 85-94 [cit. 2020-05-27].

PADIATH, Quasar S., Kazumasa SAIGOH, Raphael SCHIFFMANN, Hideaki ASAHARA, Takeshi YAMADA, Anulf KOEPPEN, Kirk HOGAN, Louis J. PTÁČEK a Ying-Hui FU. Lamin B1 duplications cause autosomal dominant leukodystrophy. *Nature Genetics* [online]. 2006, **38**(10), 1114-1123 [cit. 2020-05-27].

PAI, G. S., George H. THOMAS, William MAHONEY a Barbara R. MIGEON. Complex chromosome rearrangements: Report of a new case and literature review. *Clinical Genetics* [online]. 1980, **18**(6), 436-444 [cit. 2020-05-27].

PANIER, Stephanie a Simon J. BOULTON. Double-strand break repair: 53BP1 comes into focus. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* [online]. 2014, **15**(1), 7-18 [cit. 2020-05-27].

PÂQUES, Frédéric. a James E. HABER. Two pathways for removal of nonhomologous DNA ends during double-strand break repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology* [online]. 1997, **17**(11), 6765-6771 [cit. 2020-05-27].

PARKS, Matthew M, Charles E LAWRENCE a Benjamin J RAPHAEL. Detecting non-allelic homologous recombination from high-throughput sequencing data. *Genome Biology* [online]. 2015, **16**(1) [cit. 2020-05-27].

- PAYEN, Celia, Romain KOSZUL, Bernard DUJON a Gilles FISCHER. Segmental Duplications Arise from Pol32-Dependent Repair of Broken Forks through Two Alternative Replication-Based Mechanisms. *PLoS Genetics* [online]. 2008, **4**(9) [cit. 2020-05-27].
- POLYMEROPOULOS, Mihael. H. Mutation in the Alpha-Synuclein Gene Identified in Families with Parkinson's Disease. *Science* [online]. **276**(5321), 2045-2047 [cit. 2020-05-27].
- POVIRK, Lawrence F., Tong ZHOU, Ruizhe ZHOU, Morton J. COWAN a Steven M. YANNONE. Processing of 3'-Phosphoglycolate-terminated DNA Double Strand Breaks by Artemis Nuclease. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 2006, **282**(6), 3547-3558 [cit. 2020-05-27].
- PRYOR, John M., Crystal A. WATERS, Ana AZA, Kenjiro ASAGOSHI, Christina STROM, Piotr A. MIECZKOWSKI, Luis BLANCO a Dale A. RAMSDEN. Essential role for polymerase specialization in cellular nonhomologous end joining. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2015, **112**(33), E4537-E4545 [cit. 2020-05-27].
- QING, Yulan, Zhengqi WANG, Kevin D. BUNTING a Stanton L. GERSON. Bcl2 overexpression rescues the hematopoietic stem cell defects in Ku70-deficient mice by restoration of quiescence. *Blood* [online]. 2014, **123**(7), 1002-1011 [cit. 2020-05-27].
- REITER, Lawrence T., Philip J. HASTINGS, Eva NELIS, Peter DE JONGHE, Christine VAN BROECKHOVEN a James R. LUPSKI. Human Meiotic Recombination Products Revealed by Sequencing a Hotspot for Homologous Strand Exchange in Multiple HNPP Deletion Patients. *The American Journal of Human Genetics* [online]. 1998, **62**(5), 1023-1033 [cit. 2020-05-27].
- REITER, Lawrence T., Tatsufumi MURAKAMI, Thearith KOEUTH, Liu PENTAO, Donna M. MUZNY, Richard A. GIBBS a James R. LUPSKI. A recombination hotspot responsible for two inherited peripheral neuropathies is located near a mariner transposon-like element. *Nature Genetics* [online]. 1996, **12**(3), 288-297 [cit. 2020-05-27].
- RICARD, Guénola, Jessica MOLINA, Jacqueline CHRAST, Wenli GU, Nele GHELDOLF, Sylvain PRADERVAND, Frédéric SCHÜTZ, Juan I. YOUNG, James R. LUPSKI, Alexandre REYMOND a Katherina WALZ. Phenotypic Consequences of Copy Number Variation: Insights from Smith-Magenis and Potocki-Lupski Syndrome Mouse Models. *PLoS Biology* [online]. 2010, **8**(11) [cit. 2020-05-27].
- ROYCHOWDHURY, Tanmoy a Alexej ABYZOV. Chromatin organization modulates the origin of heritable structural variations in human genome. *Nucleic Acids Research* [online]. 2019, **47**(6), 2766-2777 [cit. 2020-05-27].
- SAITO, Shinta, Aya KUROSAWA a Noritaka ADACHI. Mutations in XRCC4 cause primordial dwarfism without causing immunodeficiency. *Journal of Human Genetics* [online]. 2016, **61**(8), 679-685 [cit. 2020-05-27].
- SALEH-GOHARI, Nasrollah, Helen E. BRYANT, Niklas SCHULTZ, Kayan M. PARKER, Tobias N. CASSEL a Thomas HELLEDAY. Spontaneous Homologous Recombination Is Induced by Collapsed Replication Forks That Are Caused by Endogenous DNA Single-Strand Breaks. *Molecular and Cellular Biology* [online]. 2005, **25**(16), 7158-7169 [cit. 2020-05-27].

SEO, Soo Hyun, Albino BACOLLA, Dallah YOO, Yoon Jung KOO, Sung Im CHO, Man Jin KIM, Moon-Woo SEONG, Han-Joon KIM, Jong-Min KIM, John A. TAINER, Sung Sup PARK, Ji Yeon KIM a Beomseok JEON. Replication-Based Rearrangements Are a Common Mechanism for SNCA Duplication in Parkinson's Disease. *Movement Disorders* [online]. 2020, **35**(5), 868-876 [cit. 2020-05-27].

SHARP, Andrew J., Sierra HANSEN, Rebecca R. SELZER, Ze CHENG, Regina REGAN, Jane A. HURST, Helen STEWART, Sue M. PRICE, Edward BLAIR, Raoul C. HENNEKAM, Carrie A. FITZPATRICK, Rick SEGRAVES, Todd A. RICHMOND, Cheryl GUIVER, Donna G. ALBERTSON, Daniel PINKEL, Peggy S. EIS, Stuart. SCHWARTZ, Samantha J.L. KNIGHT a Evan E. EICHLER. Discovery of previously unidentified genomic disorders from the duplication architecture of the human genome. *Nature Genetics* [online]. 2006, **38**(9), 1038-1042 [cit. 2020-05-27].

SHAW, Christine J. a James R. LUPSKI. Non-recurrent 17p11.2 deletions are generated by homologous and non-homologous mechanisms. *Human Genetics* [online]. 2005, **116**(1-2), 1-7 [cit. 2020-05-27].

SCHMIDT, Kristina H., Joann WU a Richard D. KOLODNER. Control of Translocations between Highly Diverged Genes by Sgs1, the *Saccharomyces cerevisiae* Homolog of the Bloom's Syndrome Protein. *Molecular and Cellular Biology* [online]. 2006, **26**(14), 5406-5420 [cit. 2020-05-27].

SLACK, Andrew, P. C. THORNTON, Daniel B. MAGNER, Susan M. ROSENBERG a P. J. HASTINGS. On the Mechanism of Gene Amplification Induced under Stress in *Escherichia coli*. *PLoS Genetics* [online]. 2006, **2**(4) [cit. 2020-05-27].

STANKIEWICZ, Pawel a James R. LUPSKI. Genome architecture, rearrangements and genomic disorders. *Trends in Genetics* [online]. 2002, **18**(2), 74-82 [cit. 2020-05-27].

STANKIEWICZ, Paweł, Christine J. SHAW, Jason D. DAPPER, Keiko WAKUI, Lisa G. SHAFFER, Marjorie WITHERS, Leah ELIZONDO, Sung-Sup PARK a James R. LUPSKI. Genome Architecture Catalyzes Nonrecurrent Chromosomal Rearrangements. *The American Journal of Human Genetics* [online]. 2003, **72**(5), 1101-1116 [cit. 2020-05-27].

STEINMANN, Katharina, David N. COOPER, Lan KLUWE, Nadia A. CHUZHANOVA, Cornelia SENGGER, Eduard SERRA, Conxi LAZARO, Montserrat GILABERTE, Katharina WIMMER, Viktor-Felix MAUTNER a Hildegard KEHRER-SAWATZKI. Type 2 NF1 Deletions Are Highly Unusual by Virtue of the Absence of Nonallelic Homologous Recombination Hotspots and an Apparent Preference for Female Mitotic Recombination. *The American Journal of Human Genetics* [online]. 2007, **81**(6), 1201-1220 [cit. 2020-05-27].

STUCKI, Manuel, Julie A. CLAPPERTON, Duaa MOHAMMAD, Michael B. YAFFE, Stephen J. SMERDON a Stephen P. JACKSON. MDC1 Directly Binds Phosphorylated Histone H2AX to Regulate Cellular Responses to DNA Double-Strand Breaks. *Cell* [online]. 2005, **123**(7), 1213-1226 [cit. 2020-05-27].

SUNG, Patrick, Lumir KREJCI, Stephen VAN KOMEN a Michael G. SEHORN. Rad51 Recombinase and Recombination Mediators. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 2003, **278**(44), 42729-42732 [cit. 2020-05-27].

SYMINGTON, Lorraine S. Mechanism and regulation of DNA end resection in eukaryotes. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* [online]. 2016, **51**(3), 195-212 [cit. 2020-05-27].

TAI, Derek J C, Ashok RAGAVENDRAN, Poornima MANAVALAN, Alexei STORTCHEVOI, Catarina M SEABRA, Serkan ERDIN, Ryan L COLLINS, Ian BLUMENTHAL, Xiaoli CHEN, Yiping SHEN, Mustafa SAHIN, Chengsheng ZHANG, Charles LEE, James F GUSELLA a Michael E TALKOWSKI. Engineering microdeletions and microduplications by targeting segmental duplications with CRISPR. *Nature Neuroscience* [online]. 2016, **19**(3), 517-522 [cit. 2020-05-27].

TAN, Manuela M X, Naveed MALEK, Michael A LAWTON, Leon HUBBARD, Alan M PITTMAN, Theresita JOSEPH, Jason HEHIR, Diane M A SWALLOW, Katherine A GROSSET, Sarah L MARRINAN, Nin BAJAJ, Roger A BARKER, David J BURN, Catherine BRESNER, Thomas FOLTYNIE, John HARDY, Nicholas WOOD, Yoav BEN-SHLOMO, Donald G GROSSET, Nigel M WILLIAMS a Huw R MORRIS. Genetic analysis of Mendelian mutations in a large UK population-based Parkinson's disease study. *Brain* [online]. 2019, **142**(9), 2828-2844 [cit. 2020-05-27].

TRUONG, Lan N., Yongjiang LI, Linda Z. SHI, Patty Yi-Hwa HWANG, Jing HE, Hailong WANG, Niema RAZAVIAN, Michael W. BERNIS a Xiaohua WU. Microhomology-mediated End Joining and Homologous Recombination share the initial end resection step to repair DNA double-strand breaks in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2013, **110**(19), 7720-7725 [cit. 2020-05-27].

TSUKAMOTO, Yasumasa, Jun-ichi KATO a Hideo IKEDA. Effects of mutations of RAD50, RAD51, RAD52, and related genes on illegitimate recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. [online] 1996 **142**(2), 383–391 [cit. 2020-05-27].

TURNER, Daniel J., Marcos MIRETTI, Diana RAJAN, Heike FIEGLER, Nigel P. CARTER, Martyn L. BLAYNEY, Stephan BECK a Matthew E. HURLES. Germline rates of de novo meiotic deletions and duplications causing several genomic disorders. *Nature Genetics* [online]. 2008, **40**(1), 90-95 [cit. 2020-05-27].

VANHULLE, Kelly, Francene J. LEMOINE, Vidhya NARAYANAN, Brandon DOWNING, Krista HULL, Christy MCCULLOUGH, Melissa BELLINGER, Kirill LOBACHEV, Thomas D. PETES a Anna MALKOVA. Inverted DNA Repeats Channel Repair of Distant Double-Strand Breaks into Chromatid Fusions and Chromosomal Rearrangements. *Molecular and Cellular Biology* [online]. 2007, **27**(7), 2601-2614 [cit. 2020-05-27].

VEITIA, Reiner A. a James A. BIRCHLER. Dominance and gene dosage balance in health and disease: Why levels matter! *Journal of Pathology* [online]. 2010, **220**(2), 174–185 [cit. 2020-05-27].

WALDMAN, Alan S a R Michael LISKAY. Dependence of intrachromosomal recombination in mammalian cells on uninterrupted homology. *Molecular and Cellular Biology* [online]. 1988, **8**(12), 5350-5357 [cit. 2020-05-27].

WELLS, Robert D. Non-B DNA conformations, mutagenesis and disease. *Trends in Biochemical Sciences* [online]. 2007, **32**(6), 271-278 [cit. 2020-05-27].

- WILLIAMS, Gareth J., Susan P. LEES-MILLER a John A. TAINER. Mre11–Rad50–Nbs1 conformations and the control of sensing, signaling, and effector responses at DNA double-strand breaks. *DNA Repair* [online]. 2010, **9**(12), 1299-1306 [cit. 2020-05-27].
- WOODWARD, Karen J., Maria CUNDALL, Karen SPERLE, Erik A. SISTERMANS, Mark ROSS, Gareth HOWELL, Susan M. GRIBBLE, Deborah C. BURFORD, Nigel P. CARTER, Donald L. HOBSON, James Y. GARBERN, John KAMHOLZ, Henry HENG, M. E. HODES, Sue MALCOLM a Grace M. HOBSON. Heterogeneous Duplications in Patients with Pelizaeus-Merzbacher Disease Suggest a Mechanism of Coupled Homologous and Nonhomologous Recombination. *The American Journal of Human Genetics* [online]. 2005, **77**(6), 966-987 [cit. 2020-05-27].
- WU, Yun, Noriko KANTAKE, Tomohiko SUGIYAMA a Stephen C. KOWALCZYKOWSKI. Rad51 Protein Controls Rad52-mediated DNA Annealing. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 2008, **283**(21), 14883-14892 [cit. 2020-05-27].
- YUN, Maximina H. a Kevin HIOM. CtIP-BRCA1 modulates the choice of DNA double-strand-break repair pathway throughout the cell cycle. *Nature* [online]. 2009, **459**(7245), 460-463 [cit. 2020-05-27].
- ZHANG, Feng, Claudia M.B. CARVALHO a James R. LUPSKI. Complex human chromosomal and genomic rearrangements. *Trends in Genetics* [online]. 2009, **25**(7), 298-307 [cit. 2020-05-27].
- ZHANG, Feng, Mehrdad KHAJAVI, Anne M CONNOLLY, Charles F TOWNE, Sat Dev BATISH a James R LUPSKI. The DNA replication FoStEs/MMBIR mechanism can generate genomic, genic and exonic complex rearrangements in humans. *Nature Genetics* [online]. 2009, **41**(7), 849-853 [cit. 2020-05-27].
- ZHANG, Michael Y., Siobán B. KEEL, Tom WALSH, Ming K. LEE, Suleyman GULSUNER, Amanda C. WATTS, Ccolin C. PRITCHARD, Stephen J. SALIPANTE, Michael R. JENG, Inga HOFMANN, David A. WILLIAMS, Mark D. FLEMING, Janis L. ABKOWITZ, Mary-Claire KING a Akiko SHIMAMURA. Genomic analysis of bone marrow failure and myelodysplastic syndromes reveals phenotypic and diagnostic complexity. *Haematologica* [online]. 2014, **100**(1), 42-48 [cit. 2020-05-27].
- ZHANG, Shichuan, Hirohiko YAJIMA, HoangDinh HUYNH, Junke ZHENG, Elsa CALLEN, Hua-Tang CHEN, Nancy WONG, Samuel BUNTING, Yu-Fen LIN, Mengxia LI, Kyung-Jone LEE, Michael STORY, Eric GAPUD, Barry P. SLECKMAN, André NUSSENZWEIG, Cheng Cheng ZHANG, David J. CHEN a Benjamin P.C. CHEN. Congenital bone marrow failure in DNA-PKcs mutant mice associated with deficiencies in DNA repair. *The Journal of Cell Biology* [online]. 2011, **193**(2), 295-305 [cit. 2020-05-27].
- ZHU, Zhu, Woo-Hyun CHUNG, Eun Yong SHIM, Sang Eun LEE a Grzegorz IRA. Sgs1 Helicase and Two Nucleases Dna2 and Exo1 Resect DNA Double-Strand Break Ends. *Cell* [online]. 2008, **134**(6), 981-994 [cit. 2020-05-27].